

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

ELISA FRAGA GOMES

EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROTÓXICOS DO PRODUTO
DA PIRÓLISE DA COCAÍNA, ANIDROECGONINA METIL ÉSTER
(AEME)

VITÓRIA
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

ELISA FRAGA GOMES

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROTÓXICOS DO PRODUTO
DA PIRÓLISE DA COCAÍNA, ANIDROECGONINA METIL ÉSTER
(AEME)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ester Miyuki Nakamura Palacios
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Livia Carla de Melo Rodriguês

VITÓRIA
2017

Dedico essa dissertação aos meus pais e ao meu irmão, por todo amor e apoio incondicional.

“Não sabendo que era impossível, foi lá e fez”

Jean Cocteau

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, por escutar e atender as minhas preces.

Aos meus pais, ao meu irmão e à minha avó, por todo amor e apoio incondicional durante essa caminhada, por serem meu maior exemplo de vida e meu alicerce.

Ao meu amigo e amor Pedro, pela paciência, apoio e carinho.

As professoras que me possibilitaram a entrada na vida científica: Ester e Livia. Muito obrigada por tudo que fizeram por mim, pela confiança no meu trabalho, pelo apoio, dedicação, e principalmente por todo conhecimento compartilhado durante essa caminhada.

Aos amigos que fiz no laboratório e irei levar para a vida inteira: Cleo, não tenho palavras para agradecer toda ajuda nesses 2 anos, sua dedicação e seu amor pela ciência sempre foram um exemplo a ser seguido. Lucas, pelas risadas, implicâncias (que foram muitas rs), apoio e carinho nessa caminhada. Jean, outro implicante, que ensinou a técnica de AOPP e sempre ajudava quando surgia as dúvidas. Minha irmã siamesa Ingryd, por todos os momentos compartilhados (estudos, experimentos, dúvidas, preocupações, almoços, primeira viagem para a Argentina, babados e BOS), enfim minha irmã agradeço a Deus por ter você sempre ao meu lado, obrigada por tudo! Igor, pela ajuda de sempre. Jozué, muito mais que um técnico de laboratório ele foi um grande amigo, obrigada por sempre me salvar com suas invenções (rs), sentirei saudades do Hello de todo dia e também daquela perguntinha básica “tem café?”.

Aos amigos Jeff, Eliana, Lúcia, Dayana pela paciência e o grande apoio nessa jornada.

À todos os IC's que ajudaram na realização da minha dissertação em especial ao Matheus Cavatti e Andrezza. Muito obrigada!

À professora Suely, pelas contribuições que fez na minha qualificação, que ajudaram muito a melhorar a minha dissertação.

Ao professor Nyam, pela paciência e dedicação em ensinar a técnica de histologia.

Ao Evandro, pela disposição em ajudar com a dosagem da AEME.

Ao Fabrício e à Josidéia do Departamento da Polícia Civil do Estado do Espírito Santo por terem cedido a ampola da AEME e possibilitado esse estudo.

Ao Marquinhos, que sempre auxiliou a solucionar as dúvidas que surgiam nos protocolos de bioquímica.

Aos alunos do laboratório de imunobiologia, que gentilmente possibilitaram o uso do Varioskan.

Ao Leduc, que gentilmente forneceu o nitrogênio líquido.

À Dani do LHMI, pelo auxílio com o uso do microscópio.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro ao projeto.

À FAPES, pela bolsa concedida.

Por fim e não menos importante, aos animais utilizados nessa dissertação, sem eles nada disso seria possível.

À todos vocês minha eterna gratidão!

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	VII
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Cocaína	17
1.2 Histórico e características farmacocinéticas	18
1.3 Dados Epidemiológicos	19
1.4 Anidroecgonina Metil Éster (AEME)	20
1.5 Sistema de Recompensa Cerebral e Cocaína	23
1.6 Córtex pré-frontal e Memória Operacional.....	26
1.7 Neurotoxicidade da AEME	28
1.7.1 Estresse Oxidativo	28
1.7.2 Sistema Antioxidante	32
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 Animais	36
3.2 Droga	36
3.3 Experimento I – Efeitos da AEME sobre a memória operacional espacial	37
3.3.1 Paradigma comportamental - O labirinto radial de oito braços	37
3.3.2 Aquisição da tarefa	39
3.4 Cirurgia estereotáxica para implante de cânula intracerebroventricular	41
3.5 Administração icv da AEME	44
3.6 Administração icv de salina e acetonitrila	45
3.7 Histologia	46
3. 8 Experimento II – Efeitos da AEME sobre os parâmetros de estresse oxidativo	47
3.8.1 Análises Bioquímicas.....	47
3.8.1.1 Estresse Oxidativo.....	47
3.8.1.2 Preparo da amostra e dosagem de proteínas.....	48
3.8.1.3 Determinação dos Produtos Avançados de Oxidação Protéica (Advanced Oxidation Protein Products – AOPP).....	48
3.8.1.4 Peroxidação Lipídica.....	49

3.8.1.5 Atividade da enzima CAT.....	50
3.8.1.6 Atividade da enzima GPx.....	50
3.8.1.7 Atividade da enzima SOD.....	51
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
3.9.1 Experimento I.....	52
3.9.2 Aquisição de Tarefa	53
3.9.3 Efeitos de diferentes doses de AEME ou salina sobre a memória operacional espacial de ratos desempenhando tarefas com retardo de 1 hora no LR-8	53
3.9.4 Efeitos da administração (icv) de salina e acetonitrila sobre a memória operacional espacial de ratos desempenhando tarefas com retardo de 1 hora no LR-8	53
3. 10 Experimento II- Análise bioquímica	54
4. RESULTADOS	54
4.1 Resultados experimento I.....	54
4.1.1 Pesos corporais durante as fases de treinamento.....	54
4.1.2 Aquisição da tarefa no labirinto radial de oito braços	55
4.1.3 Sem interposição do retardo de 5s (FASE IV).....	55
4.1.4 Com interposição de retardo de 5 segundos (FASE V)	57
4.1.5 Ação das diferentes doses de AEME no ventrículo lateral sobre a memória operacional espacial de ratos	58
4.1.6 Ação da administração de salina e acetonitrila no ventrículo lateral sobre a memória operacional espacial de ratos.....	59
4.2 Localização da cânula	60
4.3 Resultados do experimento II- Análises Bioquímicas	63
4.3.1 Determinação dos Produtos Avançados de Oxidação Protéica (<i>Advanced Oxidation Protein Products</i> – AOPP)	63
4.3.2 Peroxidação Lipídica.....	64
4.3.3 Atividade da enzima CAT.....	65
4.3.4 Atividade da enzima GPx.....	67
4.3.5 Atividade da enzima SOD	68
5. DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÕES	79
7. REFERÊNCIAS	80

RESUMO

Durante a inalação do *crack*, a queima da cocaína gera um produto chamado anidroecgonina metil éster (AEME). Esse composto é exclusivamente produzido a partir da pirólise da cocaína, sendo, portanto, um marcador analítico do uso do *crack*. Existem poucos dados na literatura sobre os efeitos dessa substância no sistema nervoso central, bem como os efeitos sobre a função cognitiva e sua neurotoxicidade. O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos da AEME sobre a memória operacional espacial e em parâmetros de estresse oxidativo em estruturas cerebrais específicas como o córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HPC) e estriado (STD). Ratos treinados no labirinto radial de 8 braços (LR-8) e com cânulas implantadas no terceiro ventrículo (AP: - 0,3 mm; L: 1 mm; B: 3,6 mm) foram submetidos à administração intracerebroventricular (icv) aguda de AEME nas doses de 10, 32 ou 100 µg e após 5 minutos foram submetidos a testes com retardo de uma hora no LR-8. Um grupo independente de animais recebeu administração icv aguda de AEME nas doses de 10 (n=5), 32 (n=5), 100 µg (n=5) ou salina (n=5) para análise dos seguintes parâmetros de estresse oxidativo: produtos avançados de oxidação protéica (AOPP); peroxidação lipídica, através da análise de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS); atividade das enzimas antioxidantes, catalase (CAT); glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), no CPF, HPC e STD. Animais apresentaram significativamente maior número de erros no desempenho de tarefas com retardo de 1 hora quando receberam AEME icv nas doses de 32 µg ($P < 0,05$) e 100 µg ($P < 0,05$) quando comparados ao grupo controle (salina). Animais que receberam AEME icv na dose de 100 µg demonstraram aumento ($P < 0,05$) dos níveis de AOPP quando comparados aos animais que receberam a dose de 10 µg no STD, e também demonstraram aumento ($P < 0,05$) na atividade da enzima GPx no STD quando comparado ao grupo controle, e aos grupos que receberam as doses de 32 µg ($P < 0,05$) e 10 µg ($P < 0,01$). Como conclusão dos resultados desse estudo pode-se sugerir que a AEME prejudicou a memória operacional espacial de longa duração de maneira dose-dependente, induziu o aumento da oxidação proteica e alterou os níveis de uma das enzimas antioxidantes, a GPx, no estriado.

ABSTRACT

During the inhalation of crack, the burning of cocaine content generates a product named anhydroecgonine methyl ester (AEME). This compound is exclusively produced in the process of cocaine pyrolysis, which has been used as an analytical marker for crack use. There are few data in the literature on the effects of the substance on the central nervous system, as well as the effects on cognitive function and its neurotoxicity. The aim of this study was to investigate the effects of AEME on spatial working memory and on parameters of oxidative stress in specific brain structures such as prefrontal cortex (PFC), hippocampus (HPC) and striatum (STR). Rats well-trained in an 8-arm radial maze (8-RM) and with a cannula implanted into the third ventricle (AP: -0.3 mm; L: 1 mm; B: 3.6 mm) underwent to acute intracerebroventricular (icv) administration of AEME at doses of 10, 32 or 100 μ g and were tested 5 minutes later in 1-hour delayed tasks in the 8-RM. An independent group of animals received acute icv administration of AEME at doses of 10 (n = 5), 32 (n = 5) or 100 μ g (n = 5) or saline (n = 5) for analysis of oxidative stress parameters such as advanced oxidation protein products (AOPP); lipid peroxidation through the analysis of reactive species the thiobarbituric acid (TBA-RS); activity of antioxidant enzymes, catalase (CAT); glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD), in the PFC, HPC and STR. Animals showed significantly higher number of errors in the post-delay performance of 1-hour delayed task when they received AEME icv at doses of 32 μ g ($P < 0.05$) and 100 μ g ($P < 0.05$) when compared to the control treatment (saline). Animals receiving AEME icv at the dose of 100 μ g showed increased ($P < 0.05$) AOPP levels when compared to animals receiving the dose of 10 μ g in the STR, and also showed increased ($P < 0.05$) activity of GPx enzyme in the STR when compared to the control group, and to groups receiving the doses of 32 μ g ($P < 0.05$) and 10 μ g ($P < 0.01$). As a conclusion results of this study showed that the AEME impairs long-termed spatial working memory in a dose-dependent manner and induced increased protein oxidation and changed the levels of one of antioxidant enzymes, the GPx, in the striatum.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma da produção de cloridrato de cocaína e <i>crack</i>	18
Figura 2. Esquema da conversão da cocaína em ácido benzóico e AEME.	21
Figura 3. Estruturas da cocaína, AEME, arecolina e anatoxina-A.....	22
Figura 4. Sistema de recompensa em roedores.....	24
Figura 5. Espécies reativas ao oxigênio e sistema antioxidante..	29
Figura 6. Peroxidação Lipídica.	30
Figura 7. Enzimas antioxidantes e formação do ácido hipocloroso pela MPO.	31
Figura 8. Reações catalíticas das enzimas antioxidantes.	33
Figura 9. Fotografia do labirinto radial de oito braços	38
Figura 10. Desenho esquemático do labirinto radial na fase V	41
Figura 11. Fotografia de um rato no labirinto radial de oito braços, durante treinamento da fase V.	41
Figura 12. Cirurgia estereotáxica para implante de cânula intracerebroventricular...	43
Figura 13. Administração intracerebroventricular (icv) de AEME.	45
Figura 14. Desenho experimental I.	47
Figura 15. Desenho experimental II	48

Figura 16. Reação do MDA com o TBA na formação do cromógeno.....	49
Figura 17. Reação catalítica da enzima catalase.	50
Figura 18. Reação catalítica da enzima glutationala peroxidase.	51
Figura 19. Reação catalítica da enzima superóxido dismutase.....	52
Figura 20. Média dos pesos corporais (g) \pm e.p.m. durante as fases de treinamento no LR-8.	55
Figura 21. Média de erros \pm e.p.m. nas 10 últimas sessões de treinamento na fase IV (aprendizagem) no LR-8 (n = 18).	56
Figura 22. Média de erros \pm e.p.m. dos animais (n = 18) antes (pré-retardo) e após o retardo de 5 segundos nas sessões de treinamento da fase V para aquisição das tarefas no LR-8.....	57
Figura 23. Efeitos da administração intracerebroventricular (icv) da AEME (10 μ g, 32 μ g e 100 μ g) ou de solução controle (salina) no desempenho (média de erros \pm e.p.m) de animais (n = 18) no pré- (gráfico da esquerda) e pós-retardo (gráfico da direita) de tarefas com retardo de 1 h no LR-8.....	59
Figura 24. Efeitos da administração intracerebroventricular (icv) de salina e acetonitrila no desempenho (média de erros \pm e.p.m) de animais (n = 10) no pré- (gráfico da esquerda) e pós-retardo (gráfico da direita) de tarefas com retardo de 1 h no LR-8.	60
Figura 25. Cortes coronais de cérebro de rato.	61
Figura 26. Fotografia de corte coronal	61
Figura 27. Fotografia de fatia cerebral corada em vermelho neutro.....	62

Figura 28. Fotomicrografia de corte histológico corado com vermelho neutro62

Figura 29. Concentração (média \pm e.p.m.) dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) do CPF, HPC e STD de animais submetidos à administração icv aguda de AEME nas doses de 10 μ g (n = 5), 32 μ g (n = 5) e 100 μ g (n = 5) ou salina (n = 5).....63

Figura 30. Concentração (média \pm e.p.m.) das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) do CPF, HPC e STD de animais submetidos à administração icv aguda de AEME nas doses de 10 μ g (n = 5), 32 μ g (n = 5) e 100 μ g (n = 5) ou salina (n = 5)65

Figura 31. Concentração (média \pm e.p.m.) da atividade da enzima CAT no CPF, HPC e STD de animais submetidos à administração icv aguda de AEME nas doses de 10 μ g (n = 5), 32 μ g (n = 5) e 100 μ g (n = 5) ou salina (n = 5)66

Figura 32. Concentração (média \pm e.p.m.) da atividade da enzima GPx no CPF, HPC e STD de animais submetidos à administração icv aguda de AEME nas doses de 10 μ g (n = 5), 32 μ g (n = 5) e 100 μ g (n = 5) ou salina (n = 5)..67

Figura 33. Concentração (média \pm e.p.m.) da atividade da enzima SOD no CPF, HPC e STD de animais submetidos à administração icv aguda de AEME nas doses de 10 μ g (n = 5), 32 μ g (n = 5) e 100 μ g (n = 5) ou salina (n = 5)..69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média do tempo gasto (segundos) \pm e.p.m em cada braço visitado nas 10 últimas sessões de treinamento na fase IV no LR-8 (n = 18).....	56
Tabela 2. Média do tempo gasto (segundos) \pm e.p.m. em cada braço visitado no pré e pós-retardo de 5 segundos nas últimas 6 sessões de treinamento na fase V (n=18).....	58
Tabela 3. Média do tempo gasto (segundos) \pm e.p.m. em cada braço visitado antes (pré- retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 1 hora no LR-8 sob a administração intracerebroventricular de AEME ou salina (n = 18).....	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AEME	Anidroecgonina Metil Éster
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
AOPP	Produtos avançados de oxidação de proteínas
ATV	Área tegumental ventral
CAT	Catalase
CPF	Córtex pré-frontal
CPFm	Córtex pré-frontal medial
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ER	Espécies reativas
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSH-Px	Glutathione peroxidase reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
HEL	Pulmão de embrião humano
HPC	Hipocampo
ICV	Intracerebroventricular
IP	Intraperitoneal
KCl	Cloreto de potássio
KI	Iodeto de potássio
LR-8	Labirinto radial de oito braços
MEG	Metilecgonidina
MPO	Mieloperoxidase
MDA	Malondialdeído
Nacc	Núcleo Accumbens
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina
SAL	Salina

SOD	Superóxido dismutase
STD	Estriado
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBA-RS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cocaína

A cocaína (COC) é um alcaloide extraído das folhas da planta *Erythroxylon coca*. A partir dessas folhas, são produzidos a pasta base de cocaína, o cloridrato de cocaína, a merla, o *crack* e o óxi (Figura 1) (STEWART apud KINTZ et al., 1995).

Macerando as folhas de coca com solventes orgânicos (como o éter), forma-se a pasta base de cocaína. No processo de refinamento, a pasta base é tratada com ácido clorídrico formando o cloridrato de cocaína, que pode ser absorvido por mucosas (digestiva, nasal e retal) e ainda ser diluído em água para aplicação endovenosa (DONATO et al., 2001).

A merla consiste na cocaína remanescente na pasta base, presente junto a outros sedimentos residuais do processo de refino. Já o termo “óxi” provém da abreviação de oxidação e o produto deriva do cozimento de pasta base de cocaína com proporções variáveis de gasolina ou querosene e cal virgem (CaO) (BASTOS et al., 2011; DONATO et al., 2001).

O *crack* é obtido a partir da pasta base de cocaína, ou seja, não conjugada à molécula de cloridrato. O processo é feito pela adição da pasta base de cocaína a uma substância básica, geralmente o bicarbonato de sódio, formando o “crack”, o qual tem esse nome devido ao som do estouro da droga quando fumada (GOLDSTEIN et al., 2009).

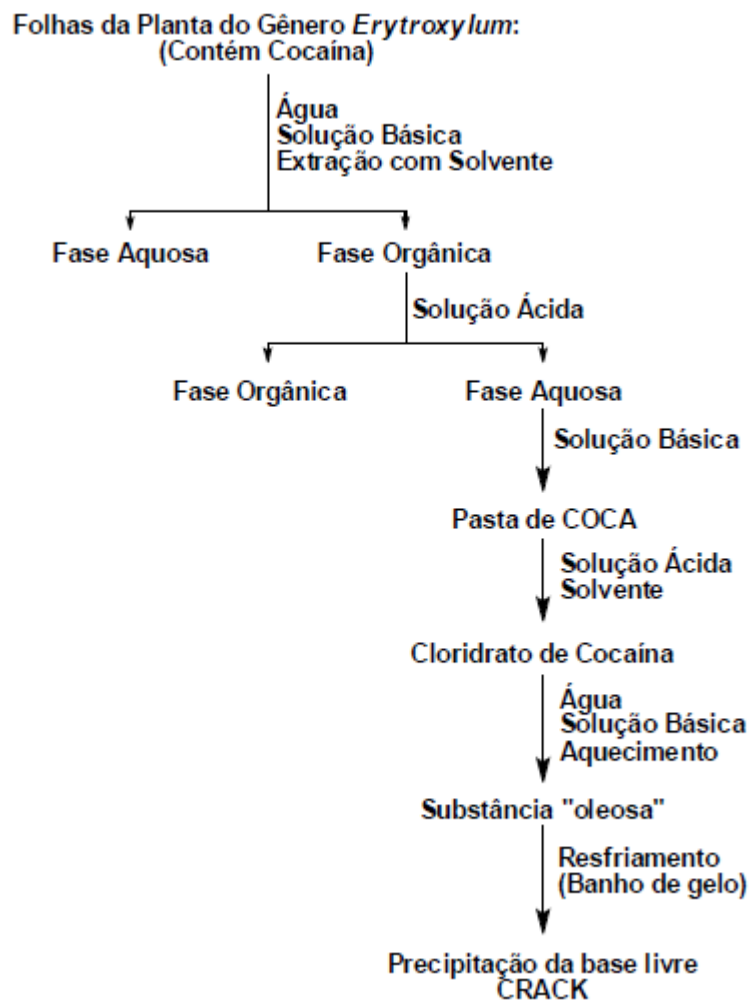


Figura 1. Fluxograma da produção de cloridrato de cocaína e *crack*, a partir da planta *Erythroxylon coca* (GARCIA, 2009).

1.2 Histórico e características farmacocinéticas

A coca é utilizada pelos índios Amara, no Peru, há mais de 1000 anos. No final da década de 60, principalmente na Europa, a cocaína teve sua comercialização sob diferentes formas, como, por exemplo, o vinho de coca Mariani, e a “coca- cola”, a qual era uma bebida isenta de álcool, mas continha cocaína. Entretanto o grande consumo de cocaína enquanto droga de abuso se popularizou na América do Norte na década de 1980 (CAULKINS apud KARCH, 1999).

O *crack* foi introduzido nos bairros pobres e marginalizados de Los Angeles, Miami e Nova York em meados da década de 80, enquanto no Brasil, as primeiras

apreensões de *crack* foram registradas a partir do início da década de 90 (REINARMAN; LEVINE, 1997; DONATO, 2011). Aparentemente, o fácil acesso, o baixo custo e o perfil farmacocinético semelhante ao da cocaína injetada (com riscos menores de transmissão de doenças infectocontagiosas) possibilitaram ao *crack* alto poder comercial, superior ao do cloridrato de cocaína para uso aspirado (HATSUKAMI; FISCHMAN, 1996).

Outro fator que possibilita maior poder comercial ao *crack* seria o seu efeito imediato. Isto se deve ao fato da cocaína ser volatilizada durante o fumo do *crack*, sendo rapidamente inalada e absorvida pelo pulmão, o qual é um órgão muito vascularizado e com grande área superficial, o que leva a uma absorção imediata. Através do pulmão, a cocaína passa para a circulação cerebral e chega rapidamente ao sistema nervoso central, fato que explica o surgimento dos efeitos estimulantes da cocaína, como a euforia e agitação. Os primeiros efeitos surgem entre 10 a 15 segundos, enquanto os efeitos após a via nasal ocorrem após 10 a 15 minutos (GARCIA, 2009)

1.3 Dados Epidemiológicos

Segundo estimativas recentes do Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crimes (UNODC, 2015), agência da Organização das Nações Unidas (ONU) encarregada de coordenar as atividades internacionais de fiscalização de entorpecentes, a estimativa de utilização de drogas ilícitas no ano de 2013 foi de 0,4 por cento da população mundial adulta com idades entre 15 e 64 anos. Dentre essas drogas ilícitas, os maiores mercados e as taxas mais altas de prevalência de consumo da cocaína são encontrados na América do Norte, América do Sul, e as regiões da Europa Ocidental e Central. Entretanto, na América do Sul, a prevalência anual do uso da cocaína teve um aumento estimado de 0,7 por cento em 2010 (1,84 milhões de usuários) para 1,2 por cento em 2012 (3,34 milhões de usuários), e o Brasil representa o maior mercado de cocaína da América do Sul.

Para a análise da prevalência do consumo de drogas no Brasil, foi realizado em 2005 o II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas em 108 cidades com mais de 200 mil habitantes, na faixa etária de 12 a 65 anos, encomendado pela Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (SENAD) ao Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas (CEBRID). Nesse estudo, demonstrou-se que a prevalência do consumo de cocaína na vida foi de 2,9% e o consumo do *crack* foi de 0,7%; pode-se afirmar que houve um aumento significativo no consumo em relação a um outro levantamento realizado no ano de 2001 nas 107 cidades brasileiras com população acima de 200 mil habitantes, em que o consumo de cocaína foi de 2,3% e o de *crack* 0,4%. A faixa etária para maior consumo de cocaína e crack na vida foi entre 25 e 34 anos tanto no levantamento realizado em 2001 quanto no realizado em 2005. Em relação ao gênero, o sexo masculino teve a maior prevalência no consumo tanto de cocaína quanto de *crack* nos dois levantamentos.

Mais recentemente Laranjeira e colaboradores (2012) realizaram um estudo populacional sobre os padrões de uso de álcool, tabaco e drogas ilícitas na população brasileira, no qual demonstraram que a prevalência do uso uma vez na vida da cocaína em pó pela população adulta (18 anos ou mais) foi de 3,8%, representando cerca de 5 milhões de brasileiros, enquanto a prevalência do uso do *crack* uma vez na vida foi de 1,3%, ou seja 1,7 milhões de brasileiros.

1.4 Anidroecgonina Metil Éster (AEME)

A Anidroecgonina Metil Éster (AEME) ou Metilecgonidina (MEG) é o principal produto da degradação térmica da cocaína, ou seja, é produzida quando ocorre o aquecimento da base de cocaína durante o fumo do *crack*. Aproximadamente 50 a 80% de cocaína é convertida em AEME e ácido benzoico, nas temperaturas entre 255-440 °C, podendo sofrer variações de acordo com as condições experimentais. (Figura 2). Esse produto da pirólise pode ser detectado na urina, cabelo, saliva, transpiração e sangue de usuários de *crack* (SCHEIDWEILER et al., 2000). Porém não é encontrado em amostras biológicas de usuários de cocaína, por isso é

considerado um marcador específico do uso de *crack* (TOENNES et al., 2003; MARTIN et al., 1989; NAKAHARA e ISHIGAMI, 1991).

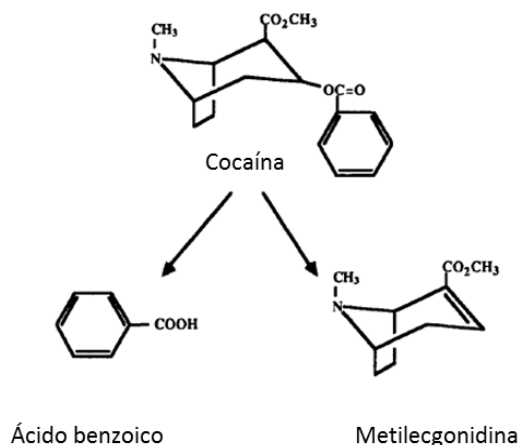


Figura 2. Esquema da conversão da cocaína em ácido benzóico e AEME, ou Metilecgonidina. Extraído e traduzido de (MARTIN et al., 1989).

Em relação aos parâmetros farmacocinéticos da AEME, sabe-se que o volume de distribuição médio de cocaína após a administração intravenosa de 4 mg/kg da droga em ovelhas foi de 3,11 L/kg, enquanto o volume de distribuição médio após a administração intravenosa de 3 mg/kg de metilecgonidina variou entre 6,6 L/kg e 10 L/kg e a meia-vida ficou em torno de 16,3 a 17,8 minutos (SCHEIDWEILER et al., 2003). Com isso, tanto a cocaína quanto a metilecgonidina têm o volume de distribuição maior que o volume sanguíneo de ovelhas, indicando que se distribuem do sangue para os outros tecidos.

Pouco se sabe sobre as vias de biotransformação da AEME, Fandiño e col. (2002) em um estudo utilizando microsomas de fígado e pulmão de ratos, demonstraram que a AEME pode ser biotransformada em: anidronorecgonina metil éster (ANEME), anidroecgonina metil éster N-óxido (AMENO), anidronorecgonina etil éster (ANEEE) e na presença de etanol, sofre uma transesterificação formando a anidroecgonina etil éster (AEEE). Sabe-se também que a AEME é rapidamente biotransformada a ecgonidina (AE), o qual é o principal metabólito excretado na urina (FANDIÑO, et al., 2002).

Em relação ao mecanismo de ação da AEME, Jacob e col. (1990) mostraram a similaridade estrutural da AEME com as estruturas da arecolina e anatoxina-A, sugerindo que a AEME possa ter uma atividade colinérgica (Figura 3). Erzouki e col. (1995), demonstraram que a administração intravenosa da AEME diminuiu a pressão arterial e os batimentos cardíacos de coelhos, porém aumentou a frequência respiratória. Esta hipotensão, em geral de início rápido, foi competitivamente antagonizada pela atropina; daí a hipótese de que a AEME pode atuar como um agonista muscarínico, *in vivo*. Assim, é possível presumir que a exposição repetida à AEME possa produzir alterações cognitivas associadas ao consumo de *crack* (SCHEIDWEILER et al., 2003).

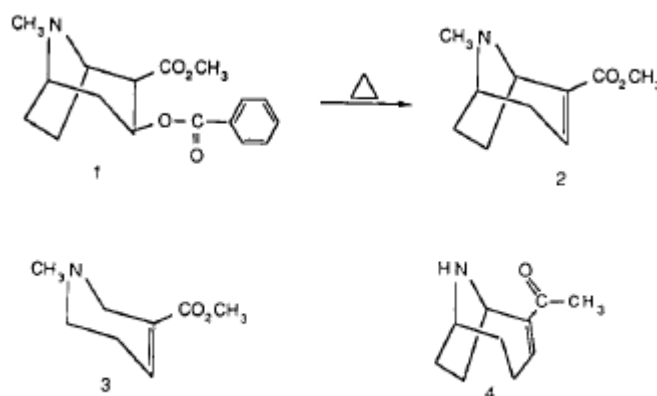


Figura 3. Estruturas da cocaína (1), AEME (2), arecolina (3) e anatoxina-A (4). A figura demonstra a similaridade entre a estrutura da AEME com a arecolina e a anatoxina-A. Extraído e traduzido de (JACOB, et al., 1990)

Yang e col. (2001) demonstraram que tanto a cocaína quanto a AEME afetam significativamente a produção de AMP cíclico e GMP cíclico, e isso foi observado, através de estimulação de receptores colinérgicos muscarínicos em cultura de células HEL299 que expressavam receptores do tipo M2. Outro estudo *in vitro*, o qual utilizou cultura de células hipocámpais de ratos, demonstrou que através do ensaio de viabilidade neuronal, os antagonistas seletivos de M1 e M3 preveniram a neurotoxicidade após 24 horas de exposição à AEME, sugerindo que a toxicidade é devida ao efeito agonista parcial dos receptores M1 e M3 (GARCIA et al., 2015)

Sobre a neurotoxicidade da AEME, Garcia e col. (2012), realizaram um estudo *in vitro* sobre a viabilidade celular em cultura primária de células hipocámpais de ratos,

no qual revelaram que a AEME apresentou um potencial neurotóxico muito maior do que a própria cocaína, e que, quando associados, ocorreu um efeito sinérgico, sugerindo um maior risco de neurotoxicidade com o uso do *crack* em comparação ao uso da cocaína em pó. Inclusive, o aumento da atividade da caspase-3 (responsável pela morte celular) em cultura de neurônios hipocâmpais após 6 horas de exposição à AEME pode ser um dos principais mecanismos de neurotoxicidade (GARCIA et al., 2015).

Existem poucos relatos na literatura sobre os efeitos comportamentais da AEME. Entretanto, foi realizado um teste para a avaliação da atividade locomotora em que ratos foram submetidos a administrações agudas de AEME (1; 3; 10 e 30 mg/kg intraperitoneal IP) ou solução controle (salina). Os resultados mostraram que comparados à salina, animais que receberam AEME apresentaram um aumento discreto na atividade locomotora, porém não foi observada uma correlação entre o aumento da locomoção com doses crescentes da AEME (GARCIA et al., 2014).

Sabe-se que quando o usuário fuma o *crack*, além de estar exposto à cocaína há o produto da pirólise, a AEME, e que essas drogas de abuso produzem alguns efeitos em comum no sistema nervoso central, destacando-se a ativação do sistema mesolímbico dopaminérgico, o qual é considerado parte integrante do sistema de recompensa (NESTLER, 2001).

1.5 Sistema de Recompensa Cerebral e Cocaína

A base do comportamento humano envolve reações a estímulos ambientais que ativam os sentidos, além de estímulos internos como pensamentos, sensações, necessidades, etc. Em conjunto, esses estímulos alteram as atitudes e motivações do indivíduo, conduzindo-o a agir ou reagir de forma a alcançar um objetivo específico ou uma recompensa (CHEN et al., 2010).

O sistema mesolímbico é considerado parte integrante do sistema de recompensa, modulando as respostas comportamentais a estímulos que ativam sensações de prazer. É constituído em parte pela área tegmental ventral (ATV) e o núcleo

accumbens (NAcc) (GOLDSTEIN e VOLKOW 2002) e o córtex pré-frontal (CPF) (GOLDSTEIN e VOLKOW 2011). Neurônios dopaminérgicos da ATV projetam-se para as áreas do NAcc, amígdala, tálamo, hipocampo, além do CPF. Juntas, essas regiões desempenham um papel crítico na adaptação e realização de comportamentos que envolvem uma recompensa (GOLDSTEIN e VOLKOW, 2002; HYMAN e MALENKA, 2001) (Figura 4).

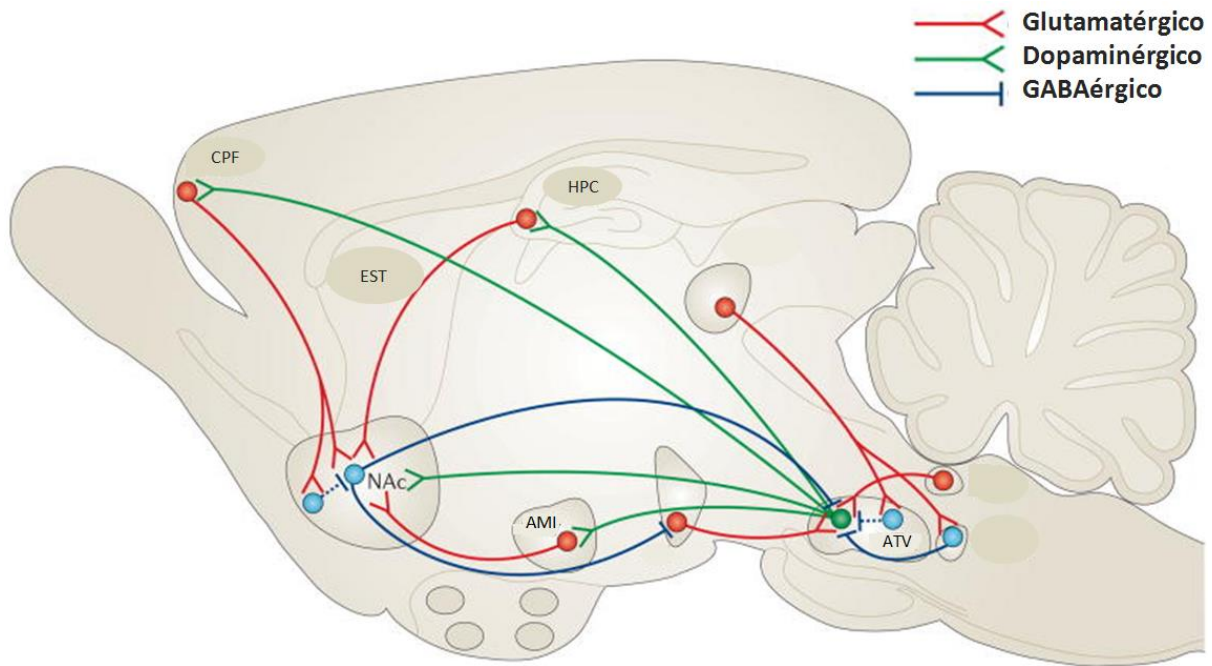


Figura 4. Sistema de recompensa em roedores. Um esquema simplificado das principais conexões entre a área tegmental ventral (ATV) e o núcleo accumbens (NAcc). (dopaminérgico = verde; glutamatérgico = vermelho; e gabaérgica = azul) do cérebro de roedor. Córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HPC), amígdala (AMI), estriado (EST) (Extraído e traduzido de RUSSO e NESTLER, 2013)

A liberação de dopamina no NAcc e CPF ocorre quando um determinado estímulo leva a uma sensação de prazer, sendo que esse estímulo pode ser desde o cheiro de um alimento, quando estamos com fome, ou um estímulo químico, como acontece no uso de drogas psicoativas, como a cocaína e o *crack*. Independente da via de administração, a cocaína é um potente bloqueador da recaptação da dopamina, serotonina e noradrenalina no NAcc, produzindo os sintomas clássicos de euforia e agitação associados à utilização da droga (DI CHIARA e IMPERATO, 1988; KOOB e BLOOM, 1988). A liberação de dopamina estimula também a procura pela sensação de prazer obtida com o uso da droga, o que faz com que o usuário volte a fazer o uso da substância responsável por essa sensação. Dessa forma,

quanto maior a capacidade de indução da adição de uma droga, maiores serão os esforços do usuário para consegui-la novamente (NESTLER, 2001).

Então, pode-se presumir que o circuito de recompensa cerebral esteja fortemente implicado nos processos neurais subjacentes à adição a drogas, a qual é em geral, acompanhada de várias deficiências neurológicas, tais como: déficits na cognição, motivação, percepção e atenção, desinibição comportamental, instabilidade emocional, depressão, anedonia, impulsividade e agressividade (MAJEWSKA, 1996; PAU et al., 2002; GARDNER, 2005).

Como já citado anteriormente o HPC e o STD são regiões cerebrais que fazem parte do sistema de recompensa cerebral e extensas evidências indicam funções críticas para o HPC e o estriado dorsal em toxicodependência e recaída para uma variedade de drogas de abuso (revisto por GOODMAN e PACKARD, 2016). O hipocampo dorsal parece desenvolver um papel no contexto de controle de drogas, relacionado com a cocaína, enquanto a região lateral do estriado dorsal (DLS) medeia a relação estímulo resposta (S-R) para cocaína e álcool (revisto por GOODMAN e PACKARD, 2016).

A conectividade em série entre NAcc, mesencéfalo e estriado dorsal pode influenciar na transição de comportamentos habituais observados na progressão da adição. O estriado dorsal codifica associações entre estímulos relacionados com a droga e respostas comportamentais (JOFFE et al., 2014; revisto por GOODMAN E PACKARD, 2016).

No contexto de múltiplos sistemas de memória, sabe-se que o HPC e o corpo estriado dorsal podem codificar componentes exclusivos de memórias relacionadas com a droga. O HPC não codifica respostas comportamentais, mas as informações adquiridas pelo HPC podem ser usadas para gerar as respostas comportamentais apropriadas relacionadas à dependência (revisto por GOODMAN e PACKARD, 2016).

Além do HPC e o STD, o CPF também faz parte do sistema de recompensa cerebral, o qual emite projeções glutamatérgicas para a ATV e o NAcc e essas

projeções excitatórias possuem um papel crítico no estabelecimento de comportamentos aditivos (CHEN et al., 2010) Figura 4. Já foi observado que o aumento da função glutamatérgica nas regiões da ATV e NAacc está associado a um comportamento compulsivo (*craving*) em usuários de entorpecentes. A utilização de antagonistas glutamatérgicos sugere que a inativação do ATV e NAcc previna esse comportamento (CHEN et al., 2010).

O CPF é responsável pelas avaliações e decisões tomadas pelo indivíduo perante uma determinada situação, analisando os riscos e benefícios antes dessa decisão. O uso crônico de drogas de abuso afeta o CPF e torna o usuário incapaz de considerar as consequências dos seus atos. Além disso, estudos de neuroimagem têm demonstrado atividade neuronal alterada no CPF de dependentes de cocaína, e os efeitos neurocognitivos estão relacionados com dificuldades na aprendizagem e memória e também nas funções executivas (LEHRMANN et al., 2003; ENGLLOT et al., 2010, GOLDSTEIN e VOLKOW 2002; BOLLA et al., 1999).

1.6 Córtex pré-frontal e Memória Operacional

Como descrito anteriormente o CPF é parte integrante do sistema de recompensa cerebral, anatomicamente ele está localizado rostralmente às áreas motoras do córtex cerebral, é subdividido em três maiores regiões: orbital, medial e lateral. As regiões orbital e medial estão envolvidas no comportamento emocional, enquanto a região lateral promove o suporte cognitivo à organização temporal de comportamento, fala e raciocínio (FUSTER, 2001).

Como o CPF é uma área de grande variedade e heterogeneidade de conexões, sugere-se que ele esteja relacionado ao controle do estado geral do córtex cerebral e atividades complexas, como planejamento e controle comportamental e emocional do indivíduo (LURIA, 1981).

O CPF está envolvido em uma diversidade de processos cognitivos e executivos, incluindo atenção, tomada de decisões, controle da resposta inibitória e integração temporal do comportamento voluntário (DALLEY et al., 2004). Contribui para o

funcionamento executivo, para o processamento de controle cognitivo, essencial para a manutenção de representação de memórias “online” (DALLEY et al., 2004).

No CPF de roedores, são consideradas três regiões: medial, lateral e ventral, sendo que a região medial está relacionada ao controle das funções executivas centrais e a memória operacional, função cognitiva muito estudada, tanto em roedores quanto em primatas (GOLDMAN-RAKIC, 1990; BADDELEY, 2003; DALLEY et al., 2004; KESNER, 2000; UYLINGS et al., 2003).

O termo memória operacional foi inicialmente proposto por Miller e col. (1960), sendo adotado posteriormente por Baddeley e Hitch em 1974 (*apud* BADDELEY, 2001), entretanto foi modificado e complementado ao longo do tempo por outros pesquisadores.

A memória operacional (ou de trabalho) processa e armazena temporariamente uma determinada informação sensorial (recente e relevante) que será manipulada durante a execução de tarefas cognitivas que envolvem aprendizado, compreensão e raciocínio, além disso, ela fornece uma interface entre percepção, memória de longo prazo e ação, aliás, este é um tipo de memória que diferencia-se das demais, por não deixar traços e não produzir arquivos. Um exemplo comum do funcionamento da memória operacional é o armazenamento temporário de um número de telefone até que o mesmo seja discado e, então, imediatamente esquecido (IZQUIERDO, 2002; BADDELEY, 2003).

Fuster (2002), ao estudar sobre as funções cognitivas do lobo frontal, evidenciou a associação do CPF (função executiva) com o córtex posterior (funções sensoriais) de forma a manter um circuito de reverberação durante a execução da memória operacional, um processo crucial para sustentação da informação enquanto durar uma função.

Na neurociência comportamental e em estudos sobre o comportamento animal, por exemplo, o termo memória operacional é associado ao paradigma do labirinto radial (MIYAKE e SHAH, 1999). Porter e col. (1997) observaram prejuízos na memória operacional em animais com lesão no CPF, em testes com retardo, no modelo do

labirinto radial de oito braços. Lesões no CPF medial (CPFm) de ratos produzem vários déficits na aquisição e retenção em testes de memória operacional, tais como resposta com retardo, alternância com retardo, e outras tarefas relacionadas (UYLINGS et al., 2003).

1.7 Neurotoxicidade da AEME

1.7.1 Estresse Oxidativo

O termo "estresse oxidativo" pode ser definido como um sério desequilíbrio entre a produção de ER (espécies reativas) e o sistema antioxidante, como pode ser visto na figura 5. O termo "espécies reativas" muitas vezes é utilizado para identificar radicais livres, os quais podem ser definidos como qualquer espécie que contém um ou mais elétrons não pareados, ou seja, os elétrons ocupam isoladamente um orbital atômico ou molecular. As ER podem ser de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN). As ERO mais importantes são: o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e o ânion hipoclorito ($OCl^{\cdot -}$), já as ERN mais relevantes são o óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot -}$) (Figura 5) (CLARK et al., 2010; HALLIWELL e WHITEMAN, 2004).

A produção de ERO e ERN é parte integrante do metabolismo humano, e em baixas concentrações exercem importantes funções biológicas, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. (VASCONCELOS et al., 2007). Entretanto, quando ocorre o aumento das espécies reativas, o estresse oxidativo pode causar danos oxidativos, como: a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, danos ao DNA e várias deficiências de enzima produzindo efeitos negativos a nível celular e sistêmico (HALLIWELL, 2007; POMIERNY-CHAMIOLO, 2013).

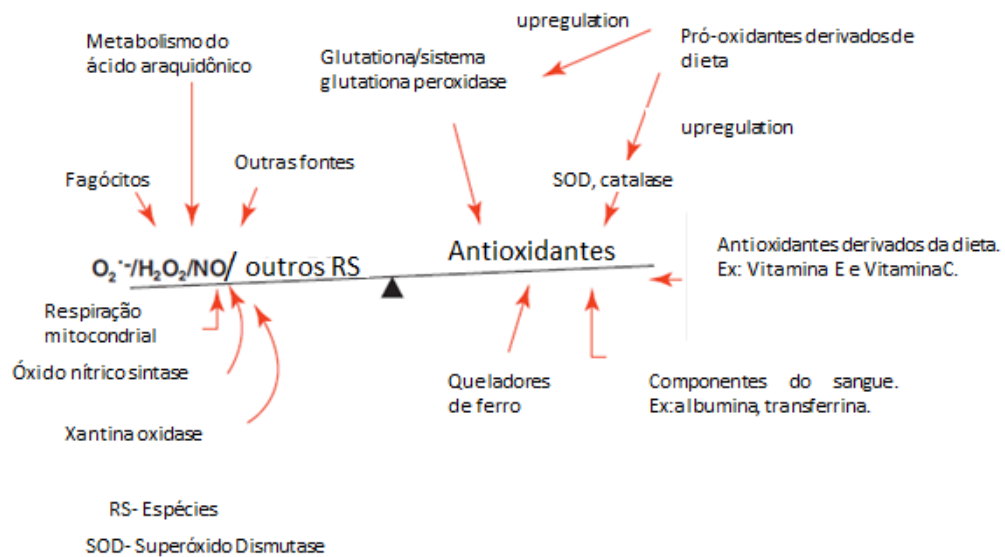


Figura 5. Espécies reativas ao oxigênio e sistema antioxidante. Esquema com as fontes de espécies reativas ao oxigênio e o sistema antioxidante. Extraída e traduzida de (HALLIWELL, B. 2011).

Dentre os danos oxidativos, a peroxidação lipídica é caracterizada pelo ataque de radicais livres aos ácidos graxos poliinsaturados na membrana celular, dando origem a uma cadeia de reações químicas, que resultam na formação de hidroperóxidos lipídicos os quais sofrem degradação formando o malondialdeído (MDA) (Figura 6). Historicamente, os primeiros biomarcadores de danos oxidativos de lipídios do cérebro que foram medidos são o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (HNE), (CHERUBINI, et al., 2005; URSO e CLARKSON, 2003). A peroxidação lipídica parece ter uma contribuição significativa para o desenvolvimento de lesões isquêmicas no cérebro ou na medula espinhal (HALLIWELL e CHIRICO, 1993).

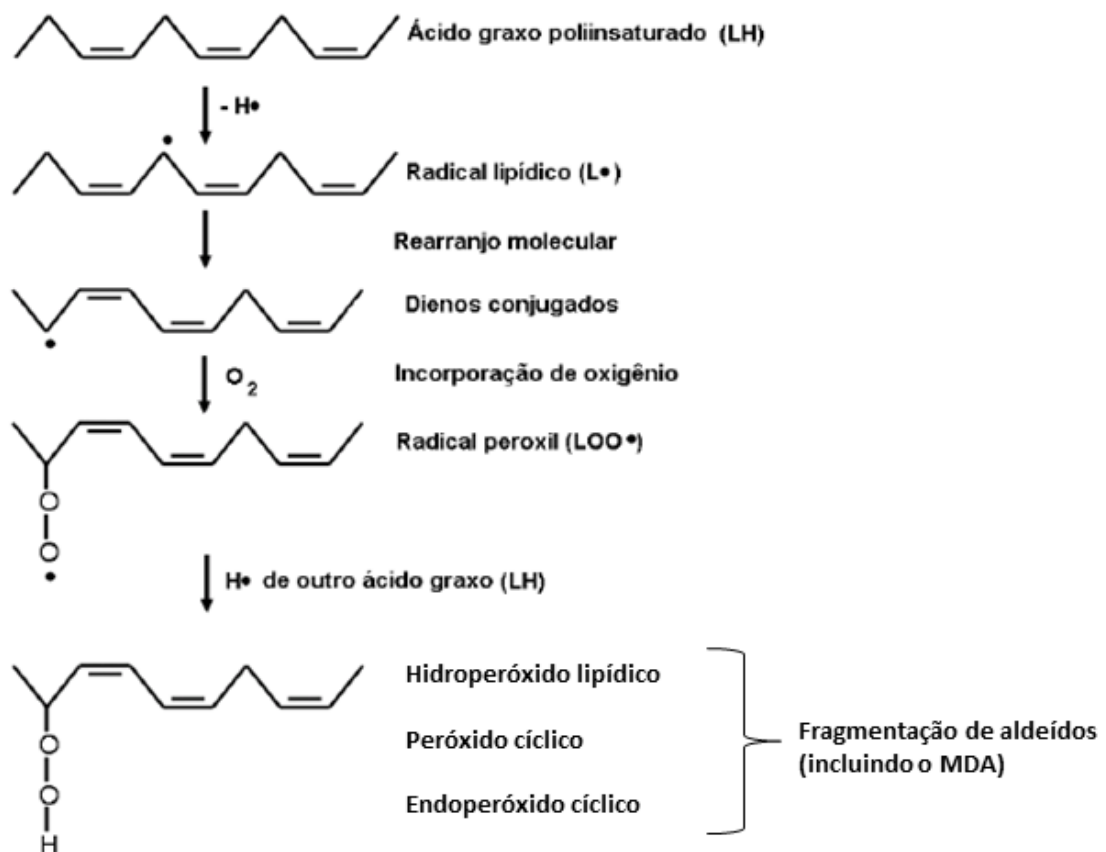


Figura 6. Peroxidação Lipídica. Extraída e modificada de (FONSECA, 2007)

Outro dano oxidativo prejudicial é aquele relacionado às proteínas. Uma das maneiras de se avaliar esses danos é a medida dos produtos avançados de oxidação de proteínas (AOPP), que tem sido relatada como um marcador importante de dano oxidativo à proteína (WITKO-SARSAT et al., 1996). O nível de AOPP é uma medida de proteínas altamente oxidadas, especialmente a albumina (SELMECI, 2005). O principal mecanismo de formação do AOPP é através do ácido hipocloroso produzido pela enzima mieloperoxidase (MPO) (KALOUSOVÁ et al., 2005), como pode-se observar na figura 7. Além de serem marcadores de estresse oxidativo, o AOPP também é considerado marcador de inflamação (ALAGOZLU et al., 2012). Níveis elevados de AOPP são encontrados em diversas doenças, tais como: diabetes, doença arterial coronariana, esclerose sistêmica, câncer colo-retal, doença de Parkinson e Alzheimer (SELMECI, 2011; ALTUNOGLU et al., 2014; MEDEIROS et al., 2016).

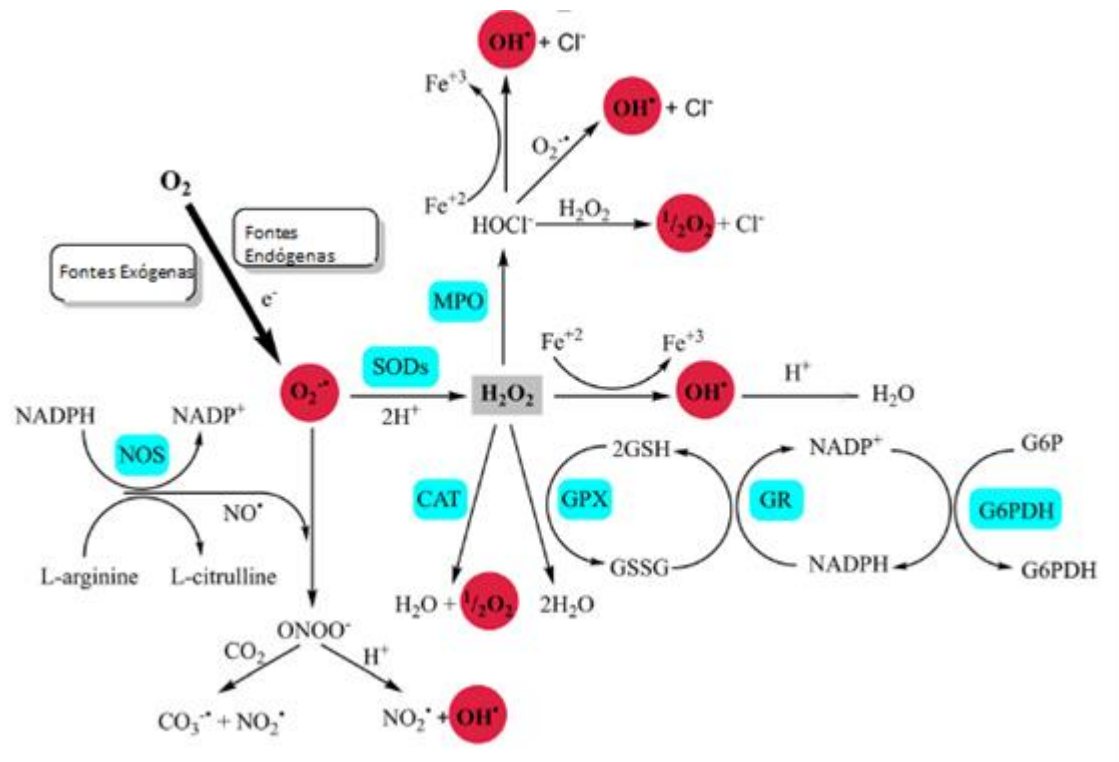


Figura 7. Enzimas antioxidantes e formação do ácido hipocloroso pela MPO. Extraída e traduzida de (NIEDZIELSKA et al., 2016).

Os radicais livres e outras ER tem um papel importante na patogênese de diversas doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, Esclerose Amiotrófica Lateral, Doença de Huntington e Doença de Parkinson (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004; PRATICÒ, 2001; PERAILE, et al., 2013). Isso se justifica pelo fato de o sistema nervoso central ser particularmente vulnerável aos danos oxidativos, uma vez que possui uma alta exigência de energia, uma alta taxa de consumo de oxigênio e um déficit relativo de sistemas de defesa antioxidantes em comparação com outros órgãos (FLOYD, 1992).

Em relação aos danos oxidativos no sistema nervoso central associados a administração de cocaína, sabe-se que a maioria dos mecanismos propostos está relacionada com a ação da dopamina. A dopamina é metabolizada não-enzimaticamente (através de auto-oxidação) para gerar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e um ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), ou enzimaticamente pela monoamina oxidase para formar H_2O_2 . Ambos radicais livres podem reagir através da reação de Fenton com íons de metais de transição (Fe^{2+}) para produzir o radical hidroxila, o qual é

altamente tóxico para as células (HERMIDA-AMEIJEIRAS, apud POMIERNY-CHAMIOLO, 2013)

Entretanto, não existem estudos *in vivo* que relatam o efeito da AEME no sistema nervoso central relacionado com o estresse oxidativo, mas com relação aos efeitos da cocaína já existem alguns dados. Lloyd e col. (1993) demonstraram a produção de ERO, como o radical hidroxila, no tecido encefálico de ratos após administração de cocaína, e Poon e col. (2007) em seu estudo *in vitro* analisou o aumento de estresse oxidativo em células progenitoras neuronais humanas expostas à 1 μ M de cocaína.

1.7.2 Sistema Antioxidante

Antioxidante pode ser definido como qualquer substância que retarda, impede ou remove o dano oxidativo a uma molécula alvo. Os antioxidantes podem ser moléculas complexas, tais como a superóxido dismutase, catalase ou mais simples tais como ácido úrico e glutathione (HALIWELL e GUTTERIDGE, 2007; revisto por GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2010).

Os antioxidantes podem ser divididos em dois tipos principais, os enzimáticos e os não enzimáticos. Os antioxidantes não enzimáticos são compostos por vitamina A (retinol), vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), glutathione reduzida (GSH), cisteína, tioredoxina e também os minerais, como cobre, ferro, selênio, manganês e zinco. Enquanto os antioxidantes enzimáticos são representados pelas enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (YU, 1994; VASCONCELOS, et al., 2007).

As principais formas de superóxido dismutases encontradas em humanos são a SOD-cobre-zinco (Cu/ZnSOD) localizada no citosol (dimérica), e a SOD-manganês (Mn/SOD) localizada na mitocôndria. Esta enzima catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 na presença de prótons H^+ , como representado nas figuras 7 e 8 (ROSS e MOLDEUS, 1991; VASCONCELOS et al., 2007).

A catalase, cujo sítio ativo contém o grupo heme, está localizada nos peroxissomos, e também é encontrada nas mitocôndrias das células do tecido cardíaco. É uma enzima antioxidante que catalisa a redução de H_2O_2 a H_2O e O_2 , como representada pelas figuras 7 e 8 (VASCONCELOS et al., 2007).

Diferente da superóxido dismutase e da catalase a GPx nos mamíferos expressam oito tipos de isoformas, que em sua maioria são peroxidases dependentes de GSH, que são capazes de reduzir H_2O_2 e peróxidos orgânicos a água ou álcool, através da oxidação da glutathiona reduzida (GSH), formando glutathiona oxidada (GSSG) como representado nas figuras 7 e 8. Dentre as oito isoformas conhecidas, a GPx 1- 4 e GPx 6 são selenoproteínas, enquanto a GPx 5, 7 e 8 apresentam uma cisteína no sítio catalítico (VASCONCELOS et al., 2007, CONRAD, 2009).

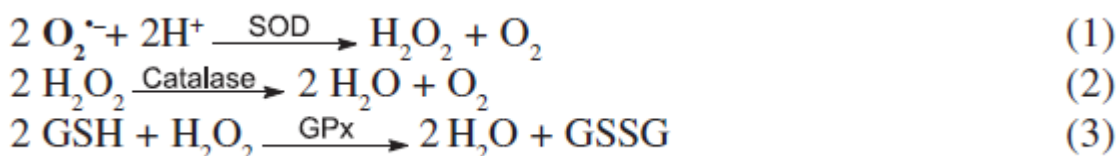


Figura 8. Reações catalíticas das enzimas antioxidantes. (1) Superóxido dismutase (SOD). O radical superóxido é dismutado em peróxido de hidrogênio e em oxigênio molecular. (2) Catalase. Degradação do peróxido de hidrogênio a oxigênio molecular e água. (3) Glutathiona peroxidase. Glutathiona reduzida e peróxido de hidrogênio são oxidados a água e glutathiona oxidada. Extraída de (VASCONCELOS et al., 2007).

Em relação aos efeitos da cocaína e o sistema antioxidante enzimático, existem alguns dados na literatura que apontam que o tratamento agudo e crônico (1 injeção/dia) de 20 mg/kg de cocaína por 10 dias, provoca a indução da atividade da GSH-Px e da SOD no córtex frontal e estriado dos ratos, os autores ainda salientam que os mecanismos compensatórios, como as atividades das enzimas antioxidantes em relação ao aumento do estresse oxidativo, foram capazes de prevenir o dano celular, já que não ocorreu nenhuma morte celular nas estruturas cerebrais estudadas. Outro estudo também observou que o tratamento com cocaína em doses baixas (10 e 30 mg/kg IP) diminuiu a atividade da catalase no estriado de ratos, consequentemente o aumento da produção de H_2O_2 . Já em um protocolo com autoadministração repetida de cocaína (0,05 ml/ infusão), ocorreu o aumento da atividade da SOD no HPC, córtex frontal e STD de ratos. Com isso destaca-se a

associação entre biomarcadores de estresse oxidativo e processos motivacionais relacionados a ingestão voluntária da cocaína em ratos (DIETRICH et al., 2005; MACÊDO et al., 2005; POMIERNY-CHAMIOLO et al., 2013).

Devido aos poucos estudos *in vivo* sobre os possíveis efeitos neurotóxicos da AEME bem como as suas alterações comportamentais, é de extrema importância que existam trabalhos que abordem os parâmetros bioquímicos e comportamentais para um melhor entendimento de processos relacionados à dependência de drogas de abuso, como a cocaína e o *crack*.

2. OBJETIVOS

Geral

Investigar os efeitos comportamentais e neurotóxicos do produto da pirólise da cocaína, a anidroecgonina metil éster (AEME).

Específicos

- (1) Avaliar os efeitos da AEME sobre a memória operacional espacial de ratos desempenhando tarefas com retardo de 1 hora no labirinto radial de oito braços;
- (2) Avaliar os efeitos da AEME sobre parâmetros oxidativos no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de animais através da análise de:

Produtos avançados de oxidação protéica (AOPP);

Peroxidação lipídica, através da análise de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS);

Atividade das enzimas antioxidantes, catalase (CAT); glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD);

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 48 ratos Wistar, machos, pesando entre 250 e 300 g, provenientes do biotério central do Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no biotério do Laboratório de Ciências Cognitivas e Neuropsicofarmacologia (LCCNPF) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas em ambiente climatizado ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$) em um ciclo claro-escuro artificial de 12 h (luzes acesas às 7 h). Para os procedimentos comportamentais, os animais tiveram livre acesso à água, e sob restrição parcial de alimento, entretanto mantendo 85% de seu peso inicial ajustado ao crescimento.

Neste estudo foram respeitados os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br), que está em conformidade com normas internacionais de pesquisa envolvendo animais. Este projeto foi submetido à Comissão de Ética de Uso e Experimentação Animal (CEUA) do CCS/UFES, aprovado sob o número 10/2015.

3.2 Droga

A AEME vem acondicionada em ampola de 1 mg AEME/mL acetonitrila (Cerilliant®) e foi adquirida pela Polícia Civil do Estado do Espírito Santo, já que se trata de substância de uso restrito (Portaria 334/98 da ANVISA). A escolha das doses de AEME utilizadas nesse estudo foram de acordo com Toennes e col. (2003) em que a concentração máxima de AEME encontrada em amostra de sangue *post-mortem* de usuários foi de 472 µg/l, a partir dessa análise foi determinado que as doses utilizadas seriam de 10 µg, 32 µg e 100 µg.

Os animais receberam administrações agudas intracerebroventriculares nas doses de 10 µg, 32 µg ou 100 µg; como solução controle foi empregada a salina. Para a solução estoque das diferentes doses foi realizada uma diluição de 1:10, utilizando a acetonitrila como solvente, e as alíquotas foram armazenadas à temperatura de 4°C.

Para os procedimentos da administração intracerebroventricular (icv) das diferentes doses de AEME, a acetonitrila foi evaporada e o resíduo foi ressuspenso em salina (0,9%) fazendo uma diluição 1:1. A quantificação da AEME foi realizada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massa (GS-MS). Além do controle feito com salina (icv), a acetonitrila (LiChrosolv®) também foi utilizada como controle nos experimentos comportamentais, pelo fato de ser o solvente presente na ampola de AEME e para confirmar que esse solvente possivelmente não prejudicaria o desempenho comportamental dos animais. Para os procedimentos, a acetonitrila foi evaporada e o resíduo foi ressuspenso em salina (0,9%) com diluição 1:1.

3.3 Experimento I – Efeitos da AEME sobre a memória operacional espacial

3.3.1 Paradigma comportamental - O labirinto radial de oito braços

Para avaliação da memória operacional espacial foi utilizado o labirinto radial de 8 braços (LR-8) modelo proposto inicialmente por Olton and Samuelson (1976). Este instrumento tem sido muito utilizado para avaliação de aprendizagem e memória, permitindo o direcionamento de pesquisas para aspectos mais específicos e sutis das funções cognitivas (OLTON et al., 1980). Vários estudos têm demonstrado o valor deste paradigma nos efeitos de drogas sobre a memória operacional (NAKAMURA et al., 1991; NAKAMURA-PALACIOS e ROELKE, 1997, RODRIGUES et al, 2011), sugerindo sua eficiência como ferramenta nos estudos de farmacologia comportamental (OLTON, 1987).

O LR-8 possui uma base octogonal com 33 cm de diâmetro e é construído em acrílico transparente. Da base octogonal partem 8 braços simétricos com 65 cm de comprimento, 10 cm de altura e paredes laterais de 4 cm de altura. No final de cada braço do labirinto está localizado um receptáculo de acrílico preto (11 cm de comprimento, 5 cm de largura e 3 cm de profundidade), onde é colocado o reforço (pedaços de amendoim).

A plataforma central do labirinto é constituída por paredes de acrílico transparente de 30 cm de altura, onde há portas deslizantes em formato de guilhotina, ligadas a fios de nylon, que ficam sob o controle do pesquisador, o qual fica a uma certa

distância do labirinto para a abertura e fechamento das portas. Para que o animal evite atravessar de um braço a outro do labirinto, existem placas de acrílico transparente de 20 cm de altura, fixadas na entrada das portas.

O aparato do labirinto é montado sobre uma armação de madeira compensada revestida por fórmica branca e sustentado por um suporte de metal que fica a 100 cm do chão. O labirinto fica sempre posicionado no mesmo local, numa sala com temperatura controlada, iluminação própria e sem a presença de ruídos que possam interferir na execução do procedimento (Figura 9).

Uma vez que a memória operacional espacial foi avaliada nesse estudo, todos os oito braços do labirinto eram similares entre si, diferindo apenas por sua localização espacial em relação aos outros braços, o que era sinalizado por pistas espaciais fixas (quadros, mesas, portas, etc.) de fácil discriminação e visualização a partir do labirinto.

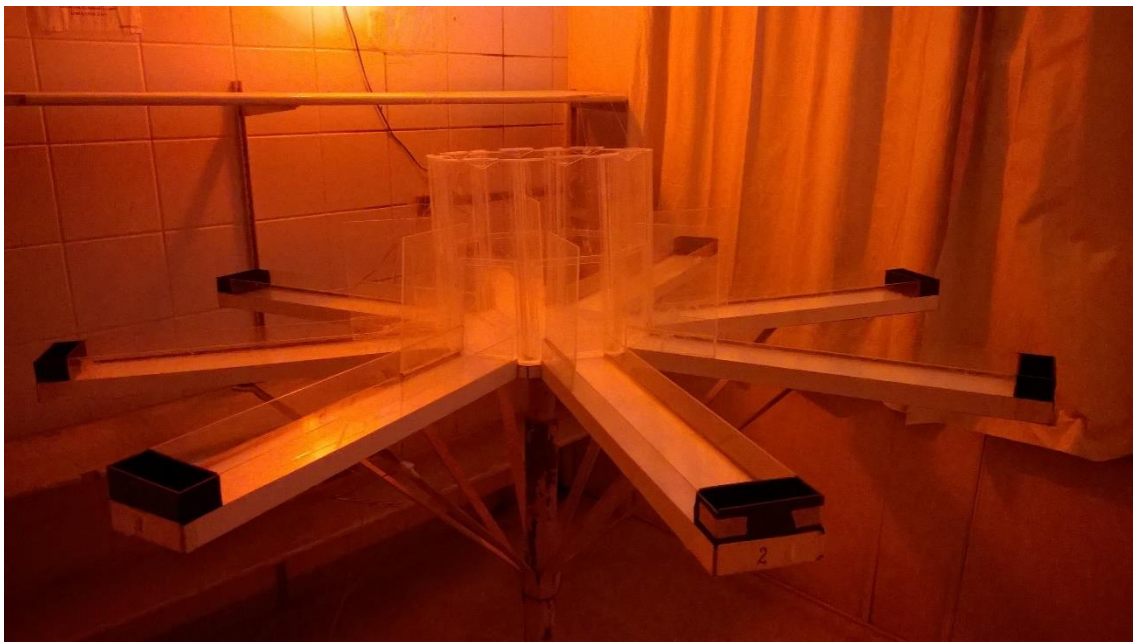


Figura 9. Fotografia do labirinto radial de oito braços, com visão de toda a sua estrutura (Acervo pessoal).

3.3.2 Aquisição da tarefa

Os animais (n=28) foram submetidos a uma sessão de treinamento diária (cinco vezes por semana) no LR-8 sob privação parcial de alimento, mantendo aproximadamente 85 % do peso corporal inicial, para possibilitar a aquisição das tarefas no decorrer dos treinos. Os pesos foram ajustados de acordo com o desempenho do animal nas seguintes fases para aquisição da tarefa:

Fase I – Os animais foram colocados no centro do labirinto com todas as portas abertas para exploração e adaptação no ambiente durante 10 minutos por duas sessões consecutivas. Não havia (reforço) nos receptáculos.

Fase II – Pedacos de amendoim foram colocados nos receptáculos e os animais tiveram livre acesso aos braços, a fim de localizar e consumir o reforço no final de cada braço, em um período de 10 min. Sempre que o reforço foi consumido, um novo pedaco de amendoim era devidamente repostado no receptáculo de origem.

- **Fase IIa** – No percurso do labirinto, nos braços, havia pequenos pedacos de amendoim, sendo essa fase denominada de “com trilha”. Essa fase perdurou até que o animal aprendeu a ir até o receptáculo. Importante ressaltar que nessa fase os animais tinham livre acesso a todos os braços.

- **Fase IIb** – Fase semelhante à anterior (fase IIa), com o detalhe de que havia reforço apenas no receptáculo, sendo portanto denominada “sem trilha”.

Fase III – Nessa fase o animal foi colocado no centro do labirinto com todas as portas abertas. Após entrar em um dos braços, a porta que permitia o acesso àquele braço era fechada. O animal era colocado novamente no centro do labirinto e todas as portas eram abertas, exceto a(s) que já tenha(m) sido visitada(s) na sessão. Essa fase terminava quando o animal percorria todos os 8 braços, e obtinha os reforços, em no máximo 10 minutos, em uma mesma sessão.

Fase IV – É a fase de aquisição da tarefa propriamente dita. Todas as portas eram abertas a cada recolocação do animal no centro do labirinto. Nessa fase não havia a

reposição dos reforços e os animais deveriam aprender a não repetir braços já visitados, em um período de 10 min. Considerava-se erro de desempenho a repetição de um braço já visitado pelo animal. Os animais foram treinados nessa fase até atingirem o critério de zero a um erro por sessão durante três sessões consecutivas. Foram necessárias cerca de 10 sessões, para que os animais atingissem esse critério.

Fase V – Os animais foram submetidos ao treinamento de memória operacional espacial. Nesta fase, foi introduzido um intervalo de retenção (retardo), entre o quarto e o quinto braços visitados. Neste procedimento, apenas quatro portas, escolhidas aleatoriamente a cada sessão de treinamento, foram abertas a cada posicionamento do animal na plataforma central e os reforços estavam disponíveis nos respectivos braços. Esta etapa é denominada de pré-retardo ou de primeira corrida. Uma vez percorridos os quatro braços selecionados, o animal retornava à sua gaiola-casa por 5 s (retardo de 5 s) e, posteriormente, era reposicionado na plataforma central. Nesse momento, todas as 8 portas eram abertas e os reforços estiveram presentes somente nos receptáculos dos quatro braços que não foram visitados anteriormente. Esta etapa foi denominada de pós-retardo ou de segunda corrida. A repetição de um braço visitado no pré- ou pós-retardo foi considerado erro de desempenho e os animais foram treinados nessa fase até atingirem um critério de zero ou um erro, no pré- e pós-retardo, por sessão durante três sessões consecutivas, (figuras 10 e 11).

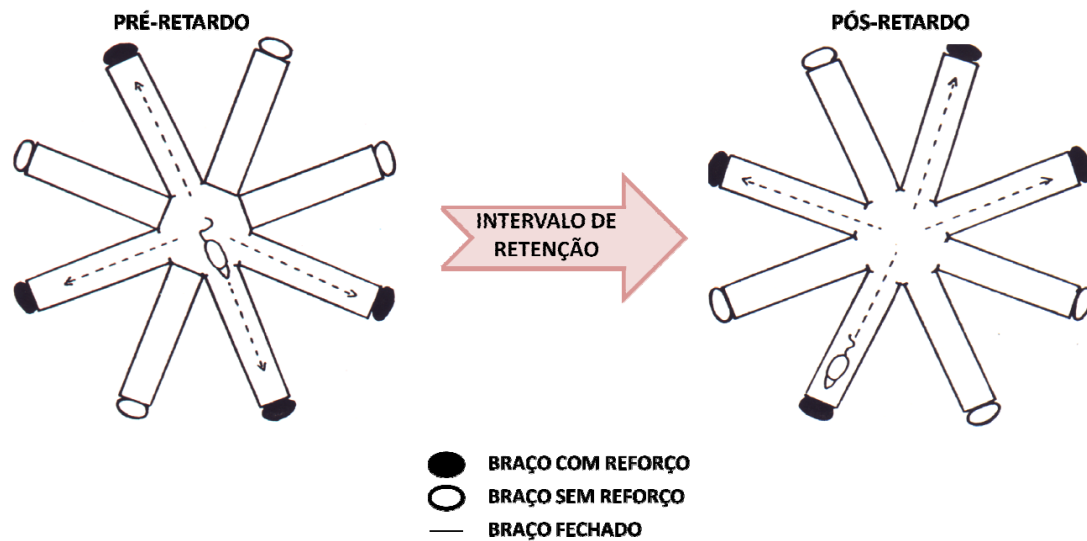


Figura 10. Desenho esquemático do labirinto radial na fase V, mostrando o pré- e pós retardo. (Extraído de NAKAMURA et al., 1991)



Figura 11. Fotografia de um rato no labirinto radial de oito braços, durante treinamento da fase V. Na figura, pode-se ver o animal comendo o reforço no receptáculo de um dos braços do LR-8 (Acervo pessoal)

3.4 Cirurgia estereotáxica para implante de cânula intracerebroventricular

Após os animais atingirem o critério de aprendizagem na fase V do labirinto radial, foi realizada a cirurgia estereotáxica para implante de cânula intracerebroventricular (icv). As cânulas foram confeccionadas artesanalmente a partir de agulhas

hipodérmicas descartáveis (0,80 x 25 mm 21G1, Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas, Ltda., PR, BR). A agulha foi cortada na extensão de 5,0 mm de sua base de plástico, porém preservando-se 5,0 mm desta, com o objetivo de ser empregada para a sustentação da cânula em uma prótese cirúrgica (descrição detalhada à frente). Protetores internos para as cânulas foram confeccionados a partir de um fio de aço inoxidável para ortodontia nº 5 (Nmartins, PR, BR). Seguem os passos da cirurgia estereotáxica.

As etapas da realização da cirurgia estereotáxica para implante de cânula no ventrículo lateral são mostradas na figura 12.

- 1- A cânula foi acoplada a uma cânula-guia fixada no estereotáxico digital (Insight EFF 338);
- 2- Os animais foram anestesiados com ketamina (75 mg/kg) e Xilasina (10 mg/kg) em um volume de 0,1 mL/100g do peso corpóreo pela via intraperitoneal (IP) e submetidos à tricotomia da parte superior da cabeça (Figura 12A);
- 3- A cabeça do animal foi fixada no aparelho estereotáxico (Insight EFF 338). Foi realizada a assepsia do local com álcool iodado e em seguida realizada anestesia local adicional por meio de um botão subcutâneo constituído de 0,2 mL de lidocaína a 1% com epinefrina (Figura 12B);
- 4- Uma pequena área ovalada de pele e tecido subcutâneo foi retirada, expondo a calota craniana e localização do bregma (Figura 12C);
- 5- Limpeza e secagem da região exposta;
- 6- As medidas estereotáxicas em relação ao bregma para o posicionamento da cânula no ventrículo lateral foram : AP: - 0,3 mm (ântero-posterior), L: 1 mm (lateral) e B: 3,6 mm (profundidade);
- 7- Perfuração de três orifícios na calota craniana: dois anteriores e um posterior por intermédio de uma mini-furadeira (Dremelmultipro + Kit, Stoelting, IL, USA) para o implante de parafusos de aço inoxidável (0,8 x 1,8 mm, MX-080-2FL, SmallParts Inc., FL, USA) que serviram para fixar a prótese (Figura 12D);
- 8- Posicionamento do crânio de modo a situar o bregma e lambda no plano horizontal e a cânula (icv) foi implantada no ventrículo lateral de acordo com as coordenadas em relação ao bregma apresentadas acima;

- 9- Preenchimento do campo cirúrgico com resina acrílica auto-polimerizável de secagem rápida (Polímero de metil metacrilato, JET, São Paulo, Brasil), soldando as peças numa prótese sólida (Figura 12E);
- 10-Colocação do protetor interno na cânula.

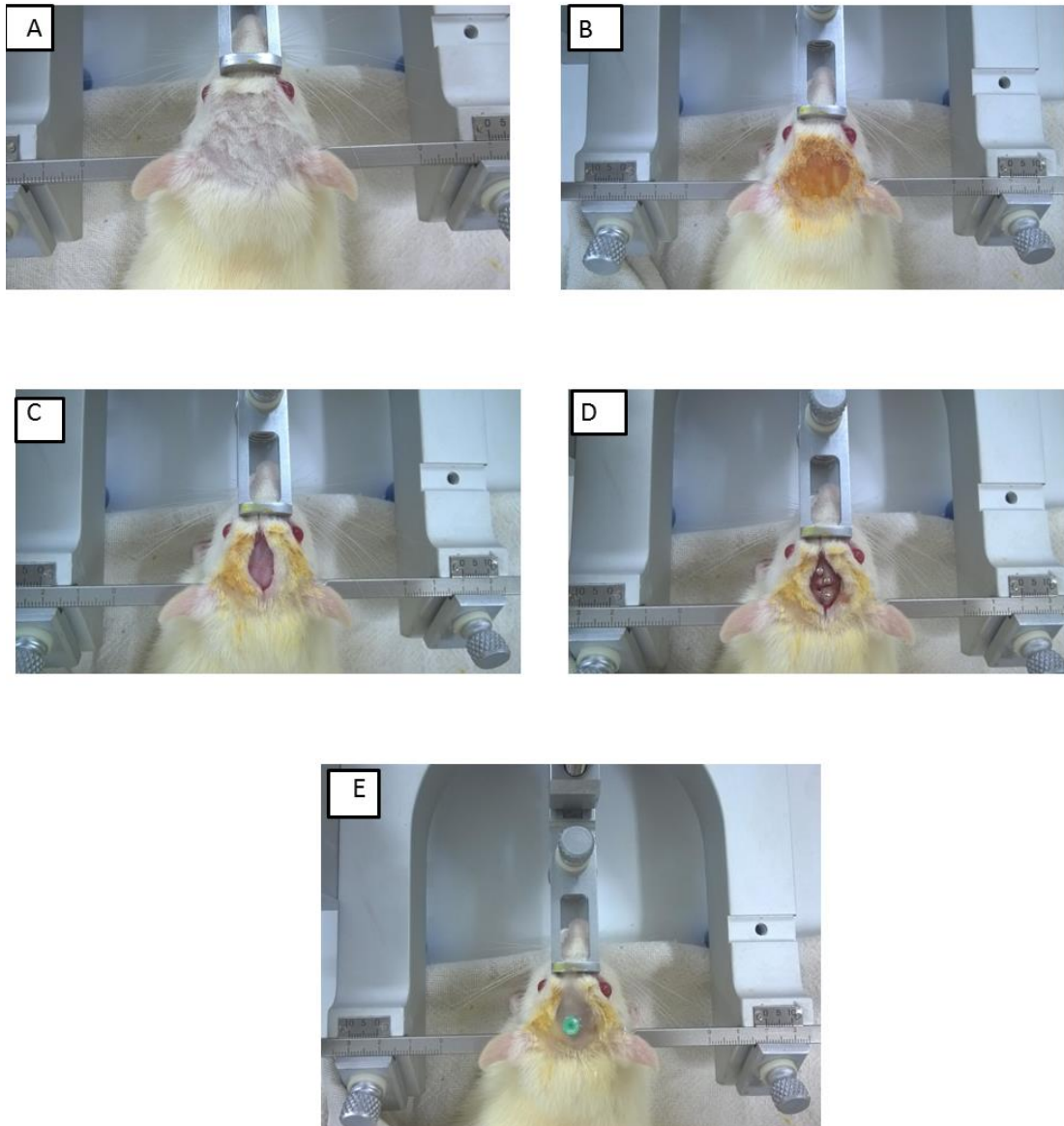


Figura 12. Cirurgia estereotáxica para implante de cânula intracerebroventricular. (A) tricotomia da parte superior da cabeça. (B) assepsia com álcool iodado e botão subcutâneo de anestésico local. (C) calota craniana exposta para as medidas das coordenadas estereotáxicas feitas em relação ao bregma (AP: - 0,3 mm; L: 1 mm; B: 3,6 mm). (D) perfuração de dois orifícios anteriores e um posterior para implante de parafusos. (E) fixação da cânula com resina acrílica e colocação de protetor interno na cânula (Acervo pessoal).

Ao término da cirurgia o animal era colocado em sua gaiola-casa, mantido em local aquecido, com água e comida *ad libitum* por alguns dias até sua completa recuperação. Todos foram submetidos a três dias de tratamento com o anti-inflamatório não esteroide FlunixinMeglumine® 1,0 mg/Kg subcutâneo (uma vez ao dia), e cinco dias de tratamento com o antibiótico Enroflorxacina® 2,5% subcutâneo (uma vez ao dia).

Após 5 dias de recuperação cirúrgica os animais voltaram a sessões diárias de treinamento no LR-8 na fase V para retorno à linha de base comportamental, ou seja, 0 a 1 erro por sessão, tanto no pré- como no pós-retardo, em 3 sessões consecutivas.

3.5 Administração icv da AEME

Os animais que perderam a cânula (n=6) ou adquiriram infecções (n= 2) ao longo dos experimentos foram excluídos e substituídos por outros com o objetivo de completar a amostra.

A sequência de doses administradas para cada animal obedeceu a um contrabalanceamento parcial, realizado através da seleção aleatória de um quadrado latino.

O uso deste modelo é de grande valor quando se utilizam amostras dependentes como no caso dos protocolos comportamentais realizados neste estudo. Deste modo, cada animal é submetido a uma ordem de administração diferente, diminuindo um possível viés consequente de sequenciamento, comum quando se administram doses em ordem crescente para todos os animais.

Para as administrações icv foi utilizada uma cânula de infusão confeccionada a partir de um cateter de 22 GA (Becton, Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda, MG, BR), adaptada de tal forma a se projetar 1 mm da extremidade da cânula implantada no ventrículo lateral. Esta cânula de infusão foi conectada a uma cânula de polietileno (PE 50), que por sua vez foi conectada a uma seringa Hamilton (Stoelting 53431, CO., IL, USA) de 10 µL. O volume total de AEME ou salina injetados foi de 5 µL, e o tempo

de infusão foi de 60 segundos (60 s), que foi determinado manualmente com o auxílio de cronômetro. A cânula injetora permaneceu por mais 60 s para garantir a difusão da droga (Figura 13).



Figura 13. Administração intracerebroventricular (icv) de AEME. Foto demonstrativa do procedimento de administração de droga icv antes do teste de memória operacional espacial no LR-8 (Acervo pessoal).

Cinco minutos após a administração de AEME ou salina o animal era levado ao LR-8 para a realização de tarefas com retardo de 1 hora. Os animais passaram por esquemas de administrações agudas diretamente no ventrículo lateral, sendo submetidos a uma única sessão de administração de drogas por dia. Foi estabelecido um intervalo de dois dias sem administração de drogas entre as sessões com droga. Neste período, eles realizavam uma sessão interdroga para verificar se havia algum efeito residual da droga sobre o seu desempenho. Só estariam aptos a uma nova administração de drogas aqueles animais que mantivessem o critério de 0 a 1 erro por sessão na sessão interdroga (Figura 14).

3.6 Administração icv de salina e acetonitrila

A metodologia utilizada para a administração icv de salina e acetonitrila foi a mesma do item 3.5, porém a randomização foi feita de maneira diferente, pois como foram somente dois grupos ($n = 10$), foi feito o *crossing over* depois de 7 dias da administração icv, ou seja, o mesmo animal recebeu a administração icv de salina e acetonitrila (Figura 14).

3.7 Histologia

Este procedimento teve como objetivo observar a exata localização das cânulas após a realização do experimento I.

Os animais foram anestesiados com altas doses de Ketamina (75 mg/kg) e Xilasina (10 mg/kg) pela via intraperitoneal (IP), para a perfusão intracardíaca de salina (0,9%) seguida de solução de formaldeído 10%, e logo após um volume de 5 µL de solução de azul de metileno a 1% (Biotec, PR, Brasil) foi administrado no ventrículo lateral por um período de 90 s acrescidos de 90 s para melhor difusão da solução.

Os cérebros foram então removidos e mantidos em solução de formaldeído a 10% por um período mínimo de 48 horas. É importante ressaltar que uma hora antes de serem seccionados os cérebros permaneceram em solução crioprotetora de sacarose a 5%, que minimiza os efeitos agressivos do congelamento.

Os cérebros foram seccionados em cortes coronais de 40 µm de espessura em um micrótomo de congelamento (JUNG-AG, Germany) e montadas em lâminas gelatinizadas. Após um período de 12 horas em estufa de secagem foi realizada a coloração das lâminas em vermelho neutro e a localização das cânulas no ventrículo lateral foi realizada através da visualização em um fotomicroscópio (Leica DM 2500) nas objetivas de 10x e 40x e também foi feita visualização dos cortes coronais em lupa (Axiocan Erc 5s- ZEISS).

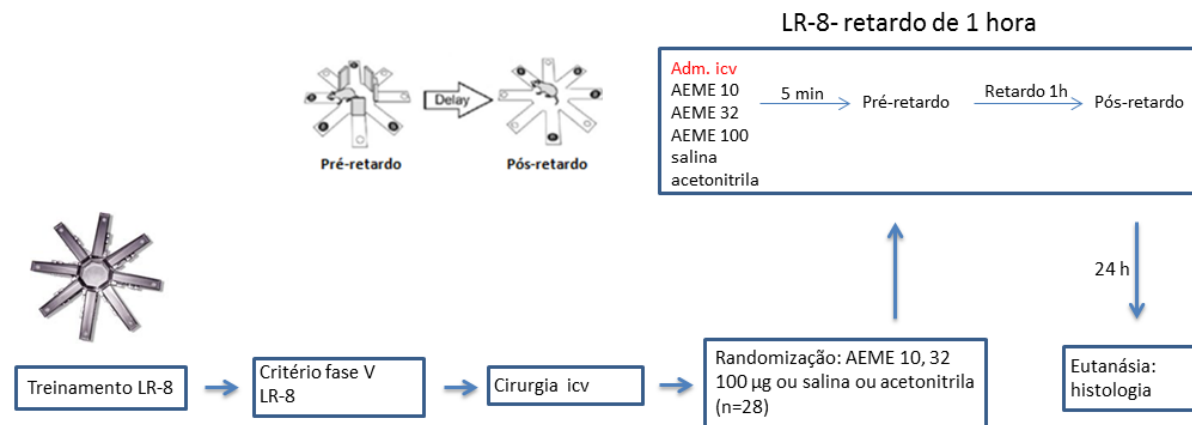


Figura 14. Desenho experimental I.

3. 8 Experimento II – Efeitos da AEME sobre os parâmetros de estresse oxidativo

3.8.1 Análises Bioquímicas

3.8.1.1 Estresse Oxidativo

Para as análises bioquímicas de estresse oxidativo foram realizadas cirurgias estereotáxicas para implante de cânulas intracerebroventriculares (icv) em 20 animais. Foi realizada uma administração única de AEME nas doses de 10 µg (n = 5), 32 µg (n = 5), e 100 µg (n = 5) e salina (n = 5) como solução controle. O volume total de AEME ou salina injetado foi de 5 µL, e o tempo de infusão foi de 60 s, que foi determinado manualmente com o auxílio de cronômetro. A cânula injetora permaneceu por mais 60 segundos para garantir a difusão da droga. Após 15 minutos da administração da droga, os animais foram decapitados para a retirada do cérebro e posterior dissecação das seguintes áreas: CPF, HPC e STD, os quais foram colocados em eppendorff previamente identificados, congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer -80°C. O tempo de eutanásia utilizado foi de acordo com Garcia e col. (2015) (Figura 15).

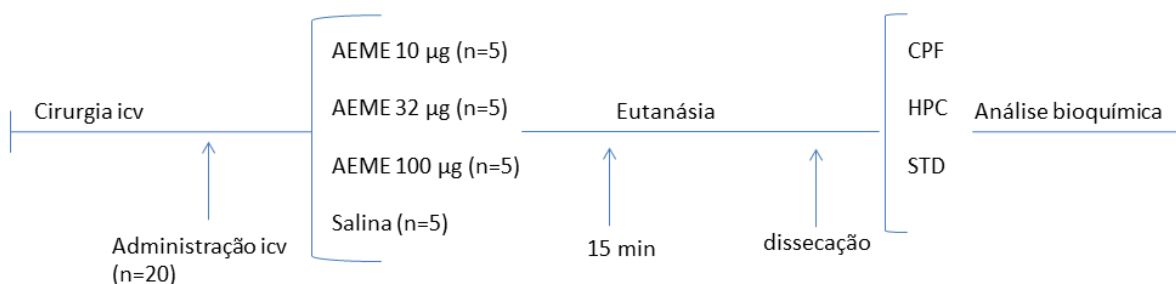


Figura 15. Desenho experimental II

3.8.1.2 Preparo da amostra e dosagem de proteínas

Estruturas cerebrais (CPF, HPC e STD) foram pesadas e homogeneizadas (com auxílio do macerador de tecidos Ten Broeck) 1:10, (peso/volume) em tampão fosfato de sódio 20 mM contendo KCl 140 mM, pH 7,4. Homogenatos foram centrifugadas a 3500 x g durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi reservado em alíquotas e armazenado a -80 °C até o momento das análises bioquímicas. Para a dosagem de proteínas foi utilizado o método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão.

3.8.1.3 Determinação dos Produtos Avançados de Oxidação Protéica (Advanced Oxidation Protein Products – AOPP)

Os Produtos Avançados de Oxidação Protéica (AOPP) foram avaliados utilizando o método descrito por Witko-Sarsat e colaboradores (1998) (WITKO-SARSAT et al., 1998). Uma alíquota de 40 µL do homogenato tecidual do CPF, HPC e STD de 20 animais, foram diluídos (1:3) em solução tampão fosfato de sódio 20 mM com KCl 140 mM, pH 7,4, ou solução de Cloramina T (0 a 10 µmol/L) e foram pipetados em cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços. Logo após, 10 µL de 1,16 mol/L de iodeto de potássio (KI) foram então adicionados, seguido de 20 µL de ácido acético glacial. A absorvância da mistura de reação foi lida a 340 nm, medido por espectrofotometria em um leitor de microplacas (modelo Varioskan® Flash), contrastado por um branco contendo 200 µL de PBS, 10 µL de KI e 20 µL de

ácido acético. A absorvância de Cloramina T a 340 nm foi linear dentro do intervalo de 0 a 100 $\mu\text{mol/L}$. O AOPP foi determinado no coeficiente de correlação maior que 0.95. O resultado foi expresso em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína.

3.8.1.4 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica foi avaliada pela quantificação de malondialdeído (MDA) utilizando-se o ácido tiobarbitúrico (TBA). O MDA reage com TBA e forma um cromógeno de cor rosa fluorescente, medido por sua absorvância em 532 nm, ou por fluorescência em 553 nm (Figura 16) (VASCONCELOS, et al., 2007).

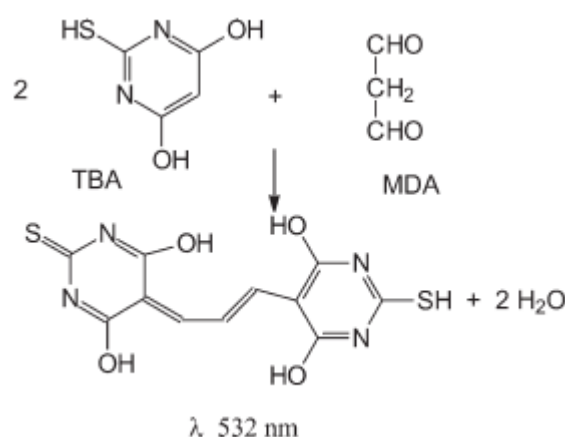


Figura 16. Reação do MDA com o TBA na formação do cromógeno. Extraída de (VASCONCELOS, et al., 2007).

A formação de lipoperóxidos foi analisada pela medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) conforme descrito por Esterbauer & Cheeseman (1990). Em alíquotas, 50 μL do sobrenadante das amostras de CPF, HPC e STD de 20 animais foi desproteínezado por precipitação com 100 μL ácido tricloroacético a 10%, homogeneizado com 150 μL de ácido tiobarbitúrico 0,67% na proporção de 1:1 (volume/volume) e aquecido em banho-maria a 100° C durante 2 horas, e depois resfriado em temperatura ambiente. Em seguida foram adicionadas à amostra 400 μL de butanol e vortexizadas por 20 segundos. Após este período, foram centrifugadas a 5000 x g por 3 minutos. Alíquotas de 250 μL da fase superior (em rosa) foram pipetadas em placa de ELISA preta e o TBA-RS foi medido pela absorvância obtida através da coloração rósea que foi medida em espectrofotômetro

(modelo Varioskan® Flash) a 535 nm. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com diferentes concentrações de 1,1,3,3-tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Os resultados foram expressos em nmol de malondialdeído por mg de proteína (nmol / mg de proteína).

3.8.1.5 Atividade da enzima CAT

A atividade da enzima CAT foi determinada segundo o método proposto por Aebi (1984), e o princípio da técnica baseia-se na redução da absorvância devido ao consumo de peróxido de hidrogênio pela ação da enzima catalase (Figura 17). Em um eppendorf foram pipetados 50 µL do sobrenadante das amostras de CPF, HPC e STD de 20 animais, com 5 µL Triton X- 100 0,1% seguido de agitação e esta mistura foi conservada em gelo durante 15 minutos. Posteriormente em um tubo de ensaio, 480 µL de tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0 foi adicionado a 480 µL de H₂O₂ 30% (volume/volume). Este meio de reação foi transferido para uma cubeta de quartzo e o branco foi feito separadamente com tampão fosfato. Após a adição da amostra, foi realizada a leitura da diminuição da absorvância do H₂O₂ em espectrofotômetro (modelo Biospectro-SP 220) a 240 nm e a atividade enzimática foi medida durante 3 minutos e 30 segundos. Para o cálculo da CAT, utilizou-se o coeficiente de extinção do H₂O₂ de 43,6 mM⁻¹cm⁻¹. Os resultados da atividade da CAT foram expressos em (nmol.min⁻¹.mg de proteína⁻¹).

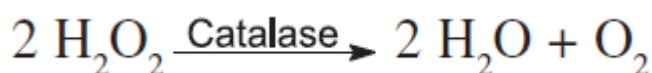


Figura 17. Reação catalítica da enzima catalase. Extraída de (VASCONCELOS, et al., 2007).

3.8.1.6 Atividade da enzima GPx

A atividade da enzima GPx foi determinada pelo método de Wendel (1981), usando hidroperóxido de tert - butila como substrato, e o princípio da técnica baseia-se no

consumo de NADPH pela enzima glutathiona redutase, que será proporcional à atividade da glutathiona peroxidase (Figura 18). Em cubeta de quartzo, foram pipetados 560 µL de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, EDTA 1.0 mM, 14 µL de GSH 1.0 mM, 14 µL de glutathiona redutase 0.1 U/mL, 7 µL de azida sódica 1.0 mM, 7 µL de NADPH 0.2 mM, 35 µL de hidroperóxido de tert-butila 0,5 mM e 63 µL do sobrenadante das amostras de CPF, HPC e STD de 20 animais. Os brancos foram preparados substituindo-se a amostra por 700 µL de tampão fosfato. Foi realizada a leitura da diminuição da absorvância em espectrofotômetro (modelo Biospectro-SP 220) a 340 nm e a atividade enzimática foi medida durante 3 minutos e 30 segundos. A atividade da GPx foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção do NADPH a 340 nm de $6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados da atividade da GPx foram expressos em $(\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1})$.



Figura 18. Reação catalítica da enzima glutathiona peroxidase. Extraída de (VASCONCELOS, et al., 2007).

3.8.1.7 Atividade da enzima SOD

Atividade da SOD foi determinada segundo o método de Bannister e Calabrese (1987), e o princípio da técnica baseia-se na inibição da auto-oxidação da adrenalina pela SOD, a qual é medida por espectrofotometria em um leitor de microplacas (modelo Varioskan® Flash) (Figura 19). Primeiramente foram feitas três curvas para a análise, sendo elas: Curva 1- foram pipetados em placa de ELISA (5 µL do sobrenadante das amostras de CPF, HPC e STD de 20 animais com 185 µL de tampão glicina 50 mM, pH 10,2, e 5 µL de catalase 0,1 mM), curva 2 (10 µL do sobrenadante, com 180 µL de tampão glicina pH 10,2, e 5 µL de catalase) e por fim a curva 3 (15 µL do sobrenadante, com 175 µL de tampão glicina pH 10,2, e 5 µL de catalase). O branco foi feito com 190 µL tampão glicina e 5 µL de catalase. A reação ocorreu à 32 ° C e a leitura pontual (endpoint) em 480 nm. Posteriormente adicionou-se 5 µL de adrenalina 1 mM em todos os poços e a inibição da sua

oxidação foi verificada durante 20 minutos com leitura de 40 em 40 s em 412 nm. Os resultados da atividade da SOD foram expressos em (nmol.min⁻¹.mg de proteína⁻¹).



Figura 19. Reação catalítica da enzima superóxido dismutase. Extraída de (VASCONCELOS, et al., 2007).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.9.1 Experimento I

Os pesos corporais dos animais foram registrados semanalmente ao longo do protocolo experimental com o objetivo de que mantivessem entre 80 e 85% ajustado ao crescimento. Os pesos corporais foram expressos como média (em gramas) e erro padrão da média (e.p.m.). Foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via para medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Bonferroni.

Para análise de desempenho no LR-8 foram observados o número de erros cometidos e o tempo gasto em cada braço visitado numa sessão de treinamento ou de teste.

A análise do número de erros cometidos foi realizada através da entrada em braços já visitados numa mesma sessão de treinamento, enquanto a análise de tempo gasto em cada braço foi avaliada pela relação entre tempo total de permanência no labirinto (em segundos) e o número de braços visitados.

Tanto os dados de desempenho como os de tempo de permanência nos braços foram representados pela média ± erro padrão da média (e.p.m.). Para todas as análises estatísticas foi empregado um nível de significância para $P < 0,05$.

Os programas SPSS versão 17.0 e GraphPadPrism versão 6.0 foram utilizados para a análise estatística e representação gráfica, respectivamente.

3.9.2 Aquisição de Tarefa

O desempenho dos animais na fase de aquisição de tarefa (fase IV) no LR-8 foi avaliado pela análise dos erros cometidos nas 10 últimas sessões de treinamento. Os erros foram definidos como a repetição de braços já visitados em uma mesma sessão de treinamento e são apresentados na forma de média de erros \pm erro padrão da média (e.p.m). Foi empregada análise de variância (ANOVA) de uma via para medidas repetidas, seguida do teste de Bonferroni para localização das diferenças estatisticamente significantes, tendo sido adotado um nível de significância de 5%. Ainda, utilizou-se uma análise de regressão linear para verificar se houve uma diminuição progressiva no número de erros.

No desempenho de tarefas com retardo de 5 segundos (fase V) foram analisados os números de erros cometidos pelos animais e o tempo de permanência em cada braço no pré- e pós-retardo. Para ambos os dados foi empregado ANOVA de uma via para medidas repetidas com *post-hoc* de Bonferroni. Aqui também foi realizada uma análise de regressão linear.

3.9.3 Efeitos de diferentes doses de AEME ou salina sobre a memória operacional espacial de ratos desempenhando tarefas com retardo de 1 hora no LR-8

Para essas análises foram considerados os números de erros cometidos e o tempo gasto em cada braço no pré- e pós-retardo de 1 h. Foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via para medidas repetidas seguidas de teste *post-hoc* de Bonferroni.

3.9.4 Efeitos da administração (icv) de salina e acetona sobre a memória operacional espacial de ratos desempenhando tarefas com retardo de 1 hora no LR-8

Para essas análises foram considerados os números de erros cometidos e o tempo gasto em cada braço no pré- e pós-retardo de 1 h. Foi utilizada teste t de *Student* para amostras pareadas.

3. 10 Experimento II- Análise bioquímica

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m). Amostras de vinte animais, de homogenato de CPF, HPC e STD foram avaliadas em duplicata ou triplicata e a média foi utilizada para a análise estatística. Foi empregada análise de variância (ANOVA) de uma via para amostras independentes, seguida do teste de Bonferroni para localização das diferenças estatisticamente significantes, tendo sido adotado um nível de significância de 5%. Os programas SPSS versão 17.0 e GraphPadPrism versão 6.0 foram utilizados para a análise estatística e representação gráfica, respectivamente.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados experimento I

4.1.1 Pesos corporais durante as fases de treinamento

Os animais foram pesados antes do início do treinamento e semanalmente ao longo das cinco fases de treinamento no LR-8 a fim de que os mesmos mantivessem um peso corporal no mínimo entre 80 a 85% do peso inicial.

A ANOVA de uma via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes [$F(5,85) = 6,958$; $P < 0,0001$] na comparação dos pesos corporais entre as fases de treinamento. O teste de Bonferroni revelou que houve uma diminuição do peso corporal dos animais ao longo das sessões II, III comparados ao peso inicial e à fase I de treinamento. Essa diminuição é esperada, uma vez que a privação de alimentos nessas fases iniciais é intensificada já que o grau de motivação é importante para que os animais aprendam a tarefa de forma satisfatória. Uma vez atingido o critério de aprendizagem, a privação era diminuída e os animais voltavam a adquirir peso de acordo com a idade, o que se pode verificar nos dados da Fase V (Figura 20).

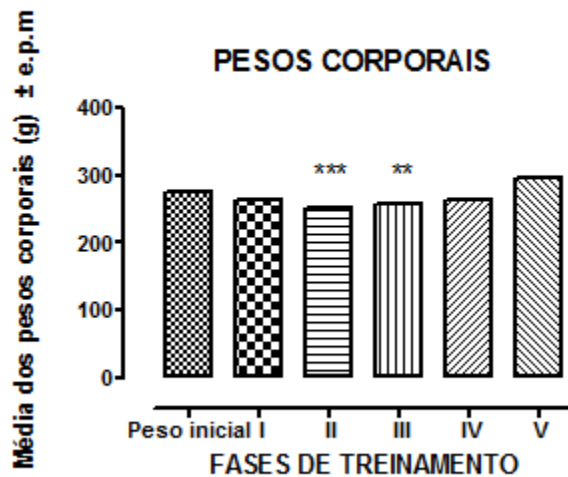


Figura 20. Média dos pesos corporais (g) ± e.p.m. durante as fases de treinamento no LR-8. *** $P < 0,0001$ comparado ao peso inicial e ao da Fase I pela ANOVA de uma via para medidas repetidas com *post-hoc* de Bonferroni.

4.1.2 Aquisição da tarefa no labirinto radial de oito braços

4.1.3 Sem interposição do retardo de 5s (FASE IV)

Os animais ($n = 18$) apresentaram uma melhora progressiva de desempenho no LR-8 com a evolução dos treinos, representada por uma diminuição gradativa do número de erros ao longo de 10 sessões de treinamento, atingindo o critério pré-estabelecido para aprendizagem, ou seja, 0 a 1 erro por sessão ao longo de 3 sessões consecutivas (Figura 21).

A ANOVA de uma via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes na comparação do número de erros cometidos entre as sessões de treinamento [$F(9,153) = 3,784$; $P < 0,01$]. O teste de Bonferroni mostrou que as três últimas sessões apresentaram uma diminuição significativa ($P < 0,01$) do número de erros em relação à primeira sessão (Figura 21)

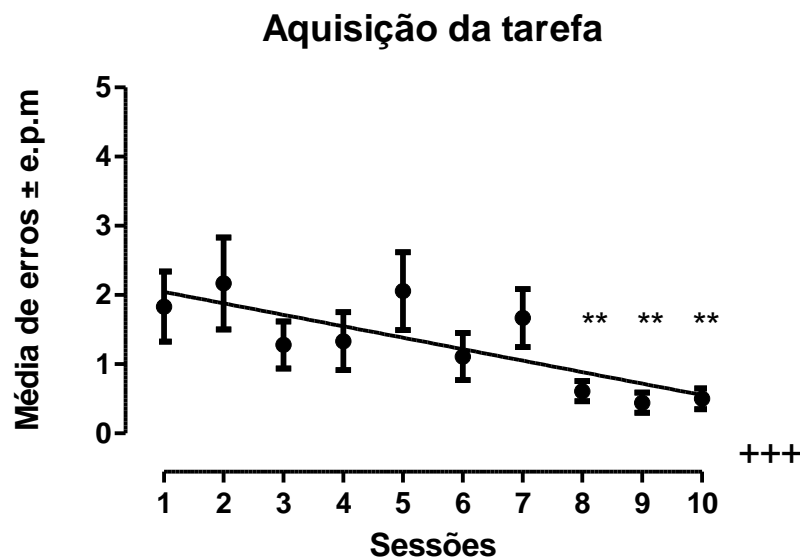


Figura 21. Média de erros \pm e.p.m. nas 10 últimas sessões de treinamento na fase IV (aprendizagem) no LR-8 ($n = 18$). +++ $P < 0,0001$ (Análise de regressão linear). ** $P < 0,01$ comparada às sessões 8, 9 e 10 (ANOVA de 1 via para medidas repetidas, seguida do teste de Bonferroni).

A análise de regressão linear demonstrou uma diminuição progressiva do número de erros até a última sessão, atingindo o critério pré-estabelecido para aprendizagem [$F(1,8) = 13,31$; $Y = -0,1657X + 2,2111$, $r = 0,6246$; $P < 0,0001$] (figura 21).

Na análise do tempo gasto em cada braço nas 10 sessões de treinamento da fase IV (aprendizagem), a ANOVA de 1 via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes [$F(9,153) = 3,338$; $P = 0,0001$] entre as sessões de treinamento (Tabela 1). O Teste de Bonferroni para comparações múltiplas demonstrou que o tempo gasto em cada braço foi significativamente menor nas sessões 4 e 8 quando comparadas a sessão 1 ($P < 0,05$), demonstrando que houve uma redução no tempo de desempenho no decorrer da aquisição da tarefa.

Tabela 1. Média do tempo gasto (segundos) \pm e.p.m em cada braço visitado nas 10 últimas sessões de treinamento na fase IV (aprendizagem) no LR-8 ($n = 18$).

Tempo gasto em cada braço (média em segundos \pm e.p.m.)			
Sessões	Média \pm e.p.m.	Sessões	Média \pm e.p.m.
1	25,8 \pm 3,4	6	21,5 \pm 3,2
2	22,0 \pm 3,4	7	18,8 \pm 2,0
3	18,6 \pm 2,3	8	18,1 \pm 2,5**
4	16,5 \pm 1,7**	9	18,8 \pm 2,6
5	20,2 \pm 2,5	10	18,9 \pm 3,8

** $P < 0,05$ comparado à sessão 1

4.1.4 Com interposição de retardo de 5 segundos (FASE V)

Na fase V, ainda para a aquisição da tarefa no LR-8 com a introdução dos retardos de 5 segundos, os animais apresentaram, no pré- e no pós-retardo, bom desempenho (0 a 1 erro) nas últimas 3 sessões de treinamento, que é pré-requisito para o aprendizado nesta fase.

A ANOVA de 1 via para medidas repetidas, detectou a existência de diferenças estatisticamente significantes entre as sessões de treinamento [$F(5,85) = 8,096$; $P = 0,0144$]. O teste de Bonferroni demonstrou que houve uma diminuição do número de erros ($P < 0,01$) quando comparadas à primeira sessão (Figura 22).

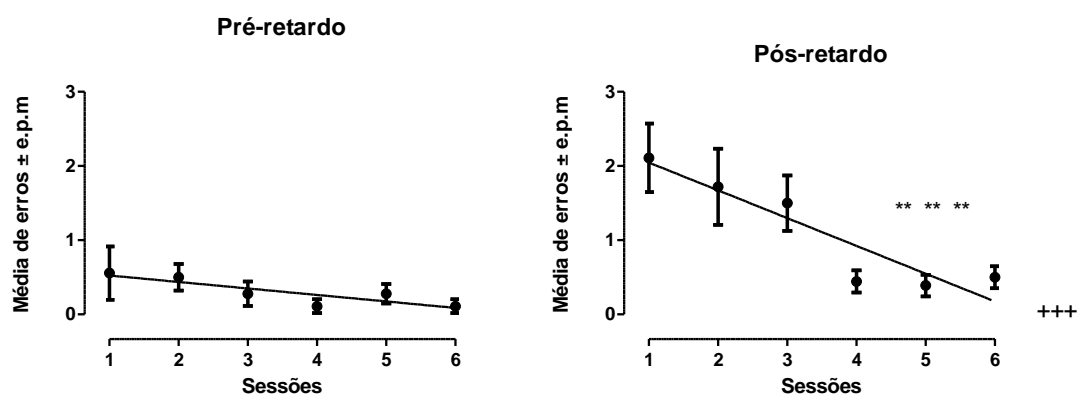


Figura 22. Média de erros \pm e.p.m. dos animais ($n = 18$) antes (pré-retardo) e após o retardo de 5 segundos nas sessões de treinamento da fase V para aquisição das tarefas no LR-8. +++ $P < 0,0001$ (Análise de regressão linear) ** $P < 0,01$ comparada à primeira sessão (ANOVA de 1 via para medidas repetidas, seguida do Teste de Bonferroni).

A análise de regressão linear demonstrou que houve diminuição progressiva do número de erros somente no pós-retardo [$F(1,4) = 24,02$; $Y = -0,3698X + 2,2389$; $r = 0,3963$; $P < 0,0001$] no decorrer das 6 sessões de treinamento nesta fase (Figura 22).

Em relação ao tempo gasto em cada braço, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes neste parâmetro tanto para o desempenho do pré- quanto do pós-retardo de 5 segundos no decorrer das 6 sessões de treinamento (Tabela 2).

Tabela 2. Média do tempo gasto (segundos) \pm e.p.m. em cada braço visitado no pré e pós-retardo de 5 segundos nas últimas 6 sessões de treinamento na fase V (n = 18).

Tempo gasto em cada braço (média em segundos \pm e.p.m.)		
Sessões	Pré-retardo	Pós-retardo
1	14,4 \pm 2,5	18,0 \pm 3,0
2	14,7 \pm 2,3	24,5 \pm 4,3
3	20,3 \pm 4,9	18,7 \pm 3,4
4	22,5 \pm 5,1	23,8 \pm 4,6
5	18,4 \pm 2,6	21,2 \pm 2,7
6	16,8 \pm 3,0	22,1 \pm 3,5

4.1.5 Ação das diferentes doses de AEME no ventrículo lateral sobre a memória operacional espacial de ratos

A figura 23 apresenta o desempenho dos animais (n = 18) no LR-8 no período de pré-retardo e pós-retardo de 1 hora, após a administração icv de AEME ou salina (Sal).

No período de pré-retardo não houve diferença significativa no desempenho dos animais nas doses de 10 μ g, 32 μ g e 100 μ g da AEME quando comparadas ao grupo controle (Figura 23, gráfico da esquerda).

A ANOVA de uma via para medidas repetidas, entretanto, detectou diferenças estatisticamente significantes entre as doses da AEME no desempenho após o retardo de 1 h [$F(3,51) = 3,422$; $P=0,0239$].

Animais submetidos à administração icv da AEME apresentaram significativamente maior número de erros nas doses de 32 μ g ($P < 0,05$) e 100 μ g ($P < 0,05$) quando comparados ao grupo controle (salina) (Fig. 23, gráfico da direita), sugerindo que a AEME administrada no ventrículo lateral, principalmente nas doses de 32 e 100 μ g prejudicou a memória operacional espacial avaliada no LR-8.

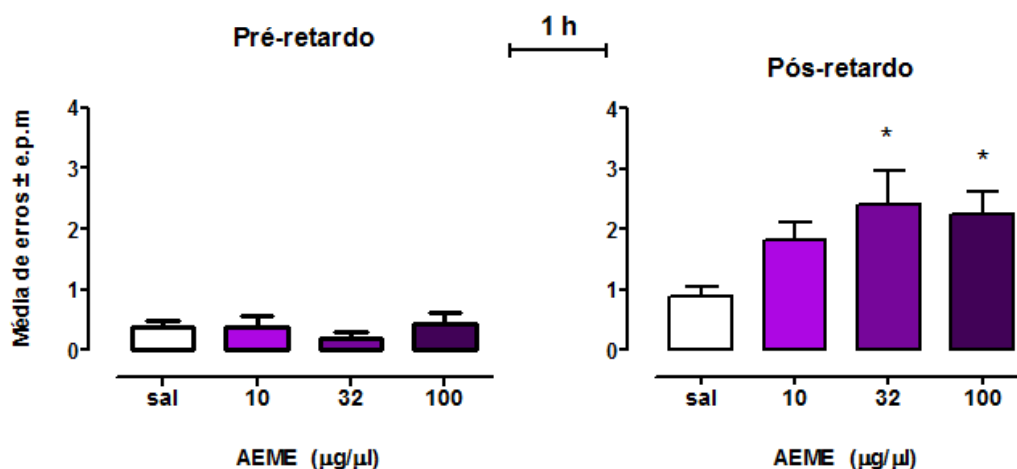


Figura 23. Efeitos da administração intracerebroventricular (icv) da AEME (10 µg, 32 µg e 100 µg) ou de solução controle (salina) no desempenho (média de erros \pm e.p.m) de animais ($n = 18$) no pré- (gráfico da esquerda) e pós-retardo (gráfico da direita) de tarefas com retardo de 1 h no LR-8. * $P < 0,05$ comparado ao grupo salina.

A tabela 3 representa o tempo gasto em cada braço no pré- e pós-retardo de 1 hora. A ANOVA de 1 via para medidas repeditas não identificou diferenças estatisticamente significantes no tempo gasto (em segundos) em cada braço, de animais submetidos a diferentes doses de AEME ou solução controle (salina), tanto no pré- quanto no pós-retardo de 1 hora de tarefas realizadas no LR-8.

Tabela 3. Média do tempo gasto (segundos) \pm e.p.m. em cada braço visitado antes (pré- retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 1 hora no LR-8 sob a administração intracerebroventricular de AEME ou salina ($n = 18$).

Tempo gasto em cada braço (média em segundos \pm e.p.m.)		
Doses de AEME/ Sal	Pré-retardo	Pós-retardo
Sal	24,2 \pm 5,7	22,5 \pm 3,9
AEME 10 µg	24,4 \pm 4,7	27,1 \pm 5,0
AEME 32 µg	32,2, \pm 8,9	27,8 \pm 4,5
AEME 100 µg	28,4 \pm 6,1	25,3 \pm 4,8

4.1.6 Ação da administração de salina e acetoneitrila no ventrículo lateral sobre a memória operacional espacial de ratos

A figura 24 apresenta o desempenho dos animais ($n = 10$) no labirinto radial de oito braços no período de pré-retardo e pós retardo de 1 hora, após a administração (icv) de salina ou acetoneitrila.

O teste *t* de *Student* para amostras pareadas, não detectou diferenças estatisticamente significantes no desempenho dos animais tanto no período de pré-retardo quando no pós-retardo de 1 hora no LR-8.

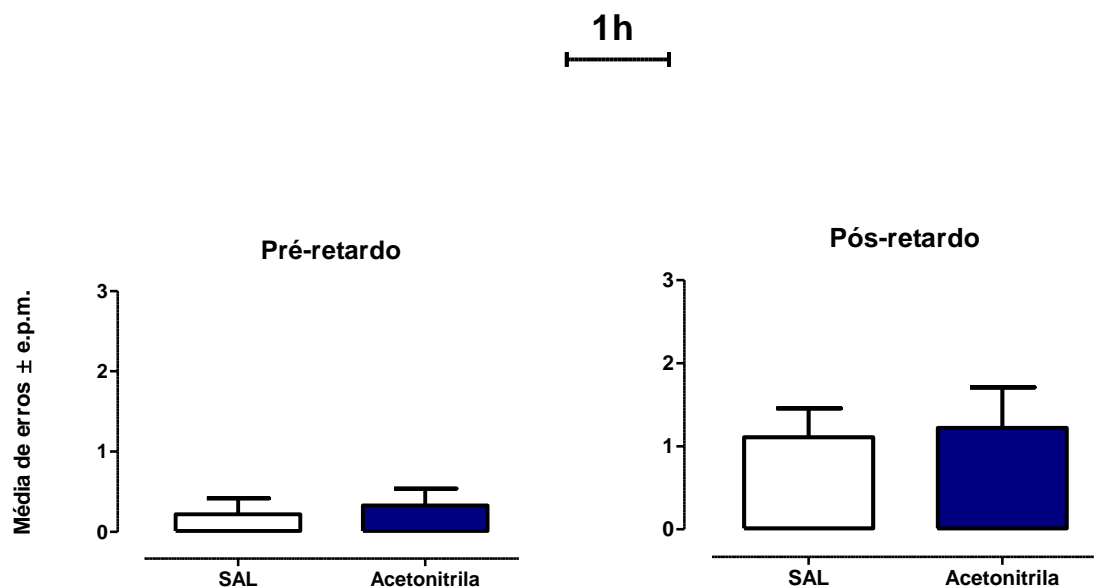


Figura 24. Efeitos da administração intracerebroventricular (icv) de salina e acetoneitrila no desempenho (média de erros \pm e.p.m) de animais ($n = 10$) no pré- (gráfico da esquerda) e pós-retardo (gráfico da direita) de tarefas com retardo de 1 h no LR-8.

4.2 Localização da cânula

Os locais de implante da cânula no ventrículo lateral marcados com azul de metileno 1% estão ilustrados em diagramas extraídos do Atlas de Paxinos e Watson (2007), como demonstrado na figura 25. Observa-se que a maioria das cânulas estava localizada na área de interesse.

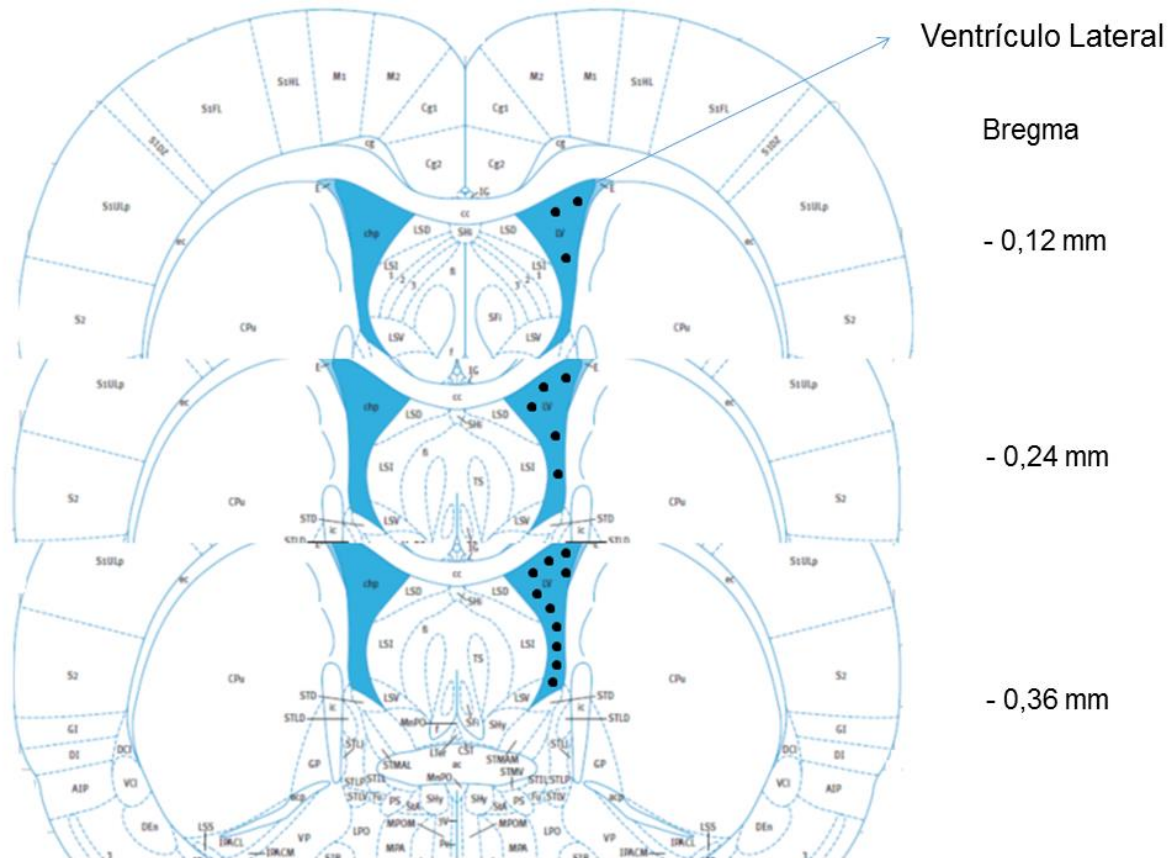


Figura 25. Cortes coronais de cérebro de rato. Nota-se que as cânulas se localizaram predominantemente na área do ventrículo lateral. Os pontos em preto representam a localização da cânula em uma amostra de animais utilizados neste estudo. Extraído de (PAXINOS e WATSON, 2007).

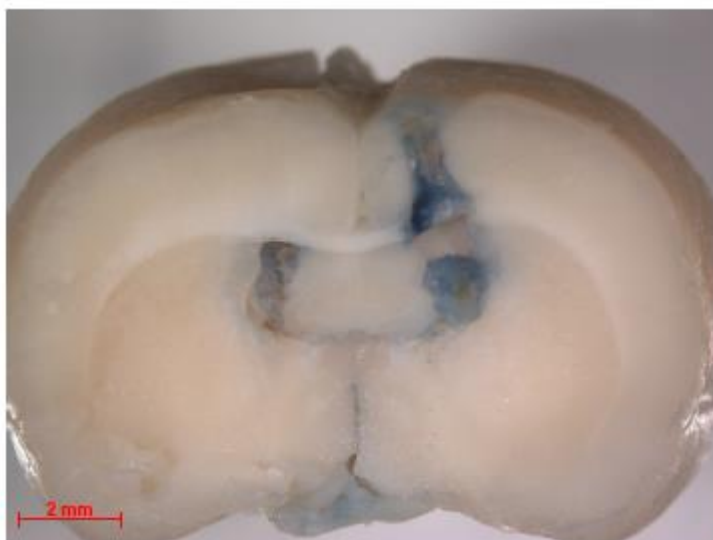


Figura 26. Fotografia de corte coronal, demonstrando a localização da cânula com destaque para a presença de azul de metileno. (Acervo pessoal).

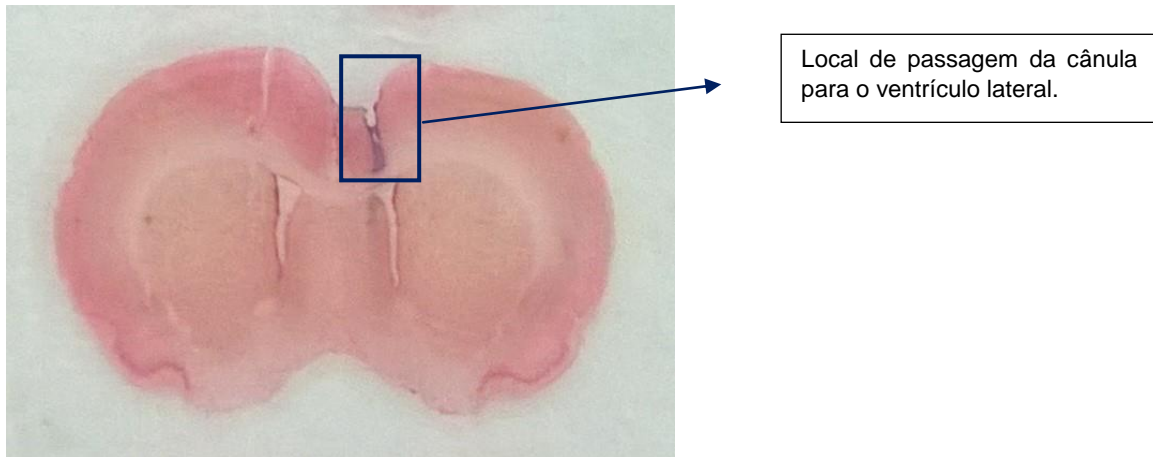


Figura 27. Fotografia de fatia cerebral corada em vermelho neutro, em destaque a localização da cânula no ventrículo lateral.(Acervo pessoal).

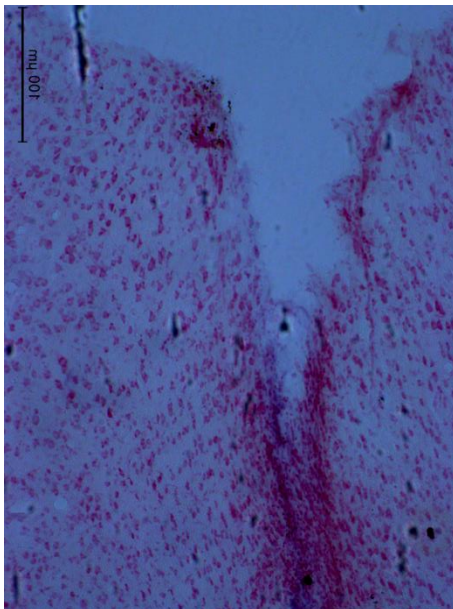


Figura 28. Fotomicrografia de corte histológico corado com vermelho neutro, mostrando o trajeto da cânula localizada na área do ventrículo lateral.(Acervo pessoal).

4.3 Resultados do experimento II- Análises Bioquímicas

4.3.1 Determinação dos Produtos Avançados de Oxidação Protéica (Advanced Oxidation Protein Products – AOPP)

Foram avaliados os produtos avançados de oxidação protéica (AOPP) em homogenato tecidual do CPF, HPC e STD de animais submetidos à administração aguda icv da AEME nas doses de 10 μg ($n = 5$), 32 μg ($n = 5$) e 100 μg ($n = 5$) ou salina ($n = 5$). Os valores da concentração (média \pm e.p.m.) de AOPP ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína) nas áreas cerebrais estudadas estão expressos na figura 29.

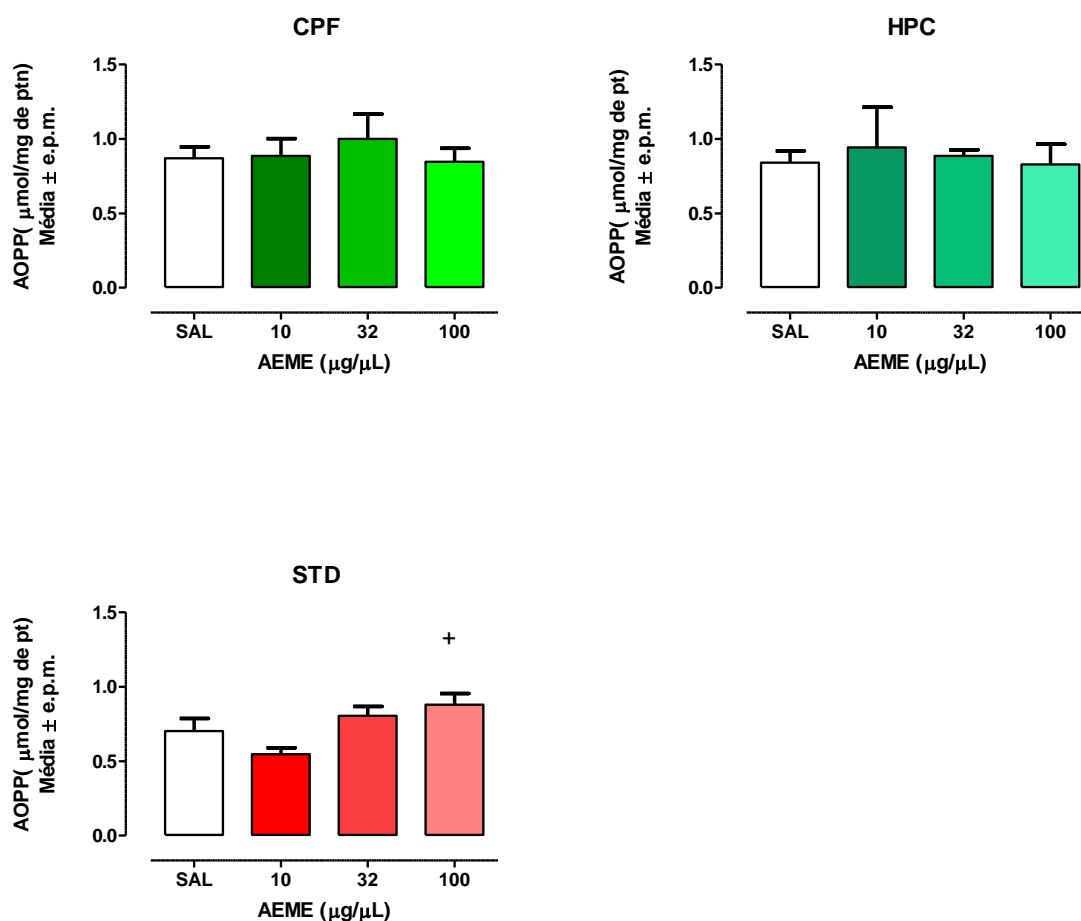


Figura 29. Concentração (média \pm e.p.m.) dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) do CPF, HPC e STD de animais submetidos à administração icv aguda de AEME nas doses de 10 μg ($n = 5$), 32 μg ($n = 5$) e 100 μg ($n = 5$) ou salina ($n = 5$). Os valores estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína. ⁺ $P < 0,05$ comparado à dose de AEME 10 μg .

A ANOVA de 1 via para as amostras independentes não detectou diferenças estatisticamente significantes no CPF e HPC nas diferentes doses da AEME ou salina.

Entretanto a ANOVA de uma via para amostras independentes detectou diferenças estatisticamente significantes [$F(3,16) = 4,363$; $P = 0,0200$] na concentração de AOPP em animais submetidos à administração aguda icv da AEME ou salina no estriado. O teste de comparações múltiplas de Bonferroni demonstrou que a concentração de AOPP no STD de animais do grupo que recebeu a dose de 100 μg de AEME foi maior ($P < 0,05$) comparado ao grupo que recebeu AEME na dose de 10 μg .

4.3.2 Peroxidação Lipídica

Foram avaliados a formação de lipoperóxidos analisados pela medida de TBA-RS em homogenato tecidual do CPF, HPC e STD de animais submetidos à administração aguda icv da AEME nas doses de 10 μg ($n = 5$), 32 μg ($n = 5$) e 100 μg ($n = 5$) ou salina ($n = 5$). Os valores da concentração (média \pm e.p.m.) de nmol de malondialdeído por mg de proteína (nmol / mg de proteína) nas áreas cerebrais estudadas estão expressos na figura 30.

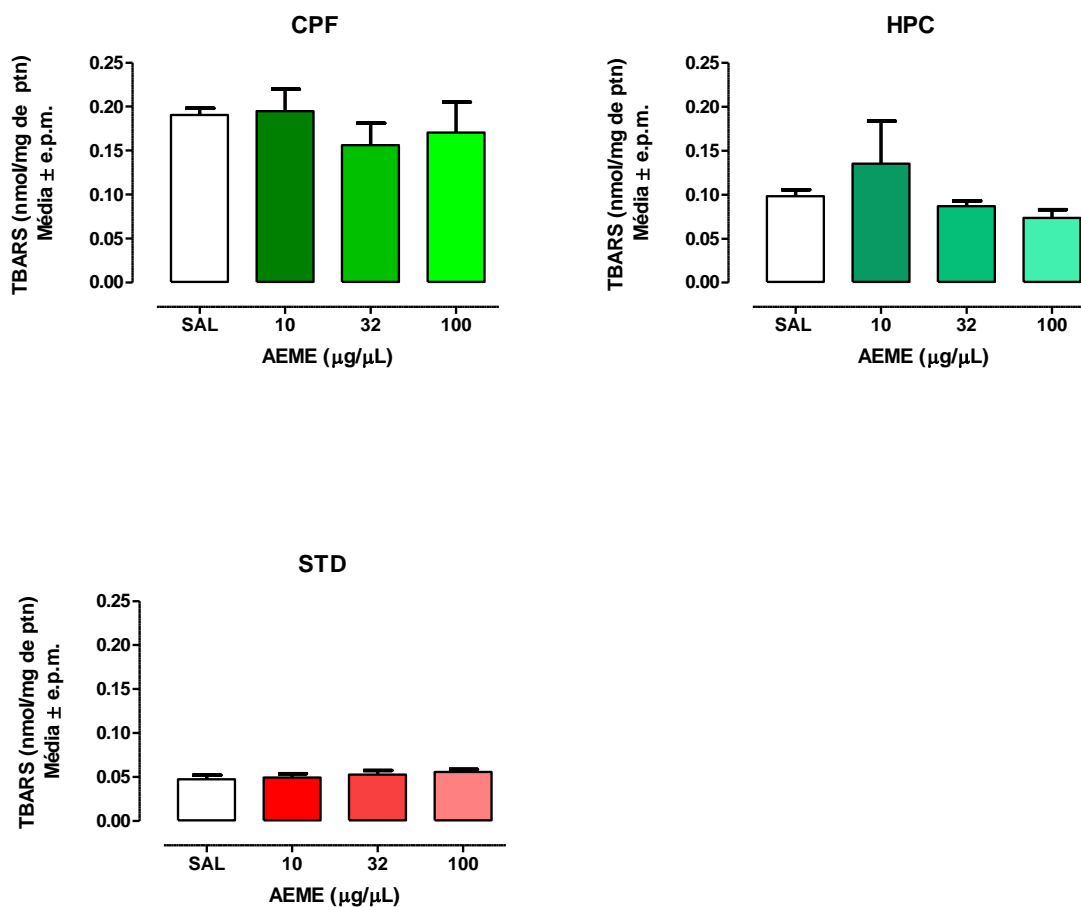


Figura 30. Concentração (média ± e.p.m.) das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) do CPF, HPC e STD de animais submetidos à administração icv aguda de AEME nas doses de 10 µg (n = 5), 32 µg (n = 5) e 100 µg (n = 5) ou salina (n = 5). Os valores estão expressos em nmol/mg de proteína.

A ANOVA de 1 via para as amostras independentes não detectou diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das áreas cerebrais analisadas nas diferentes doses da AEME em relação ao grupo controle (salina) na peroxidação lipídica.

4.3.3 Atividade da enzima CAT

A atividade da enzima antioxidante CAT foi analisada em homogenato tecidual do CPF, HPC e STD de animais submetidos à administração aguda icv de AEME nas doses de 10 µg (n = 5), 32 µg (n = 5) e 100 µg (n = 5) ou salina (n = 5). Os valores da concentração (média ± e.p.m.) ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$) nas áreas cerebrais estudadas estão expressos na figura 31.

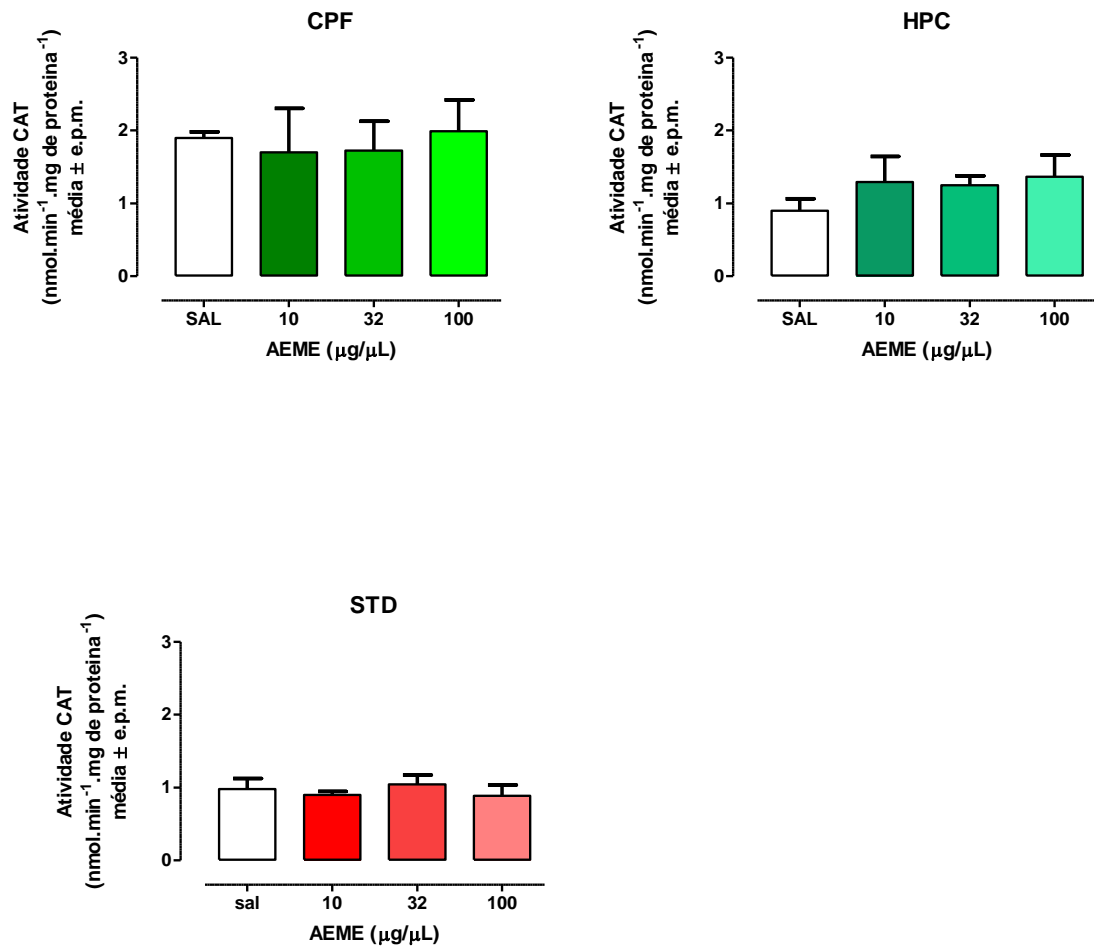


Figura 31. Concentração (média \pm e.p.m.) da atividade da enzima CAT no CPF, HPC e STD de animais submetidos à administração icv aguda de AEME nas doses de 10 μ g ($n = 5$), 32 μ g ($n = 5$) e 100 μ g ($n = 5$) ou salina ($n = 5$). Os valores estão expressos em nmol.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

A ANOVA de 1 via para as amostras independentes não detectou diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das áreas cerebrais analisadas nas diferentes doses de AEME quando comparados ao grupo controle (salina) em relação a atividade da enzima antioxidante CAT.

4.3.4 Atividade da enzima GPx

A atividade da enzima antioxidante GPx foi analisada em homogenato tecidual do CPF, HPC e STD de animais submetidos à administração aguda icv da AEME nas doses de 10 μg ($n = 5$), 32 μg ($n = 5$) e 100 μg ($n = 5$) ou salina ($n = 5$). Os valores da concentração (média \pm e.p.m.) ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$) nas áreas cerebrais estudadas estão expressos na figura 32.

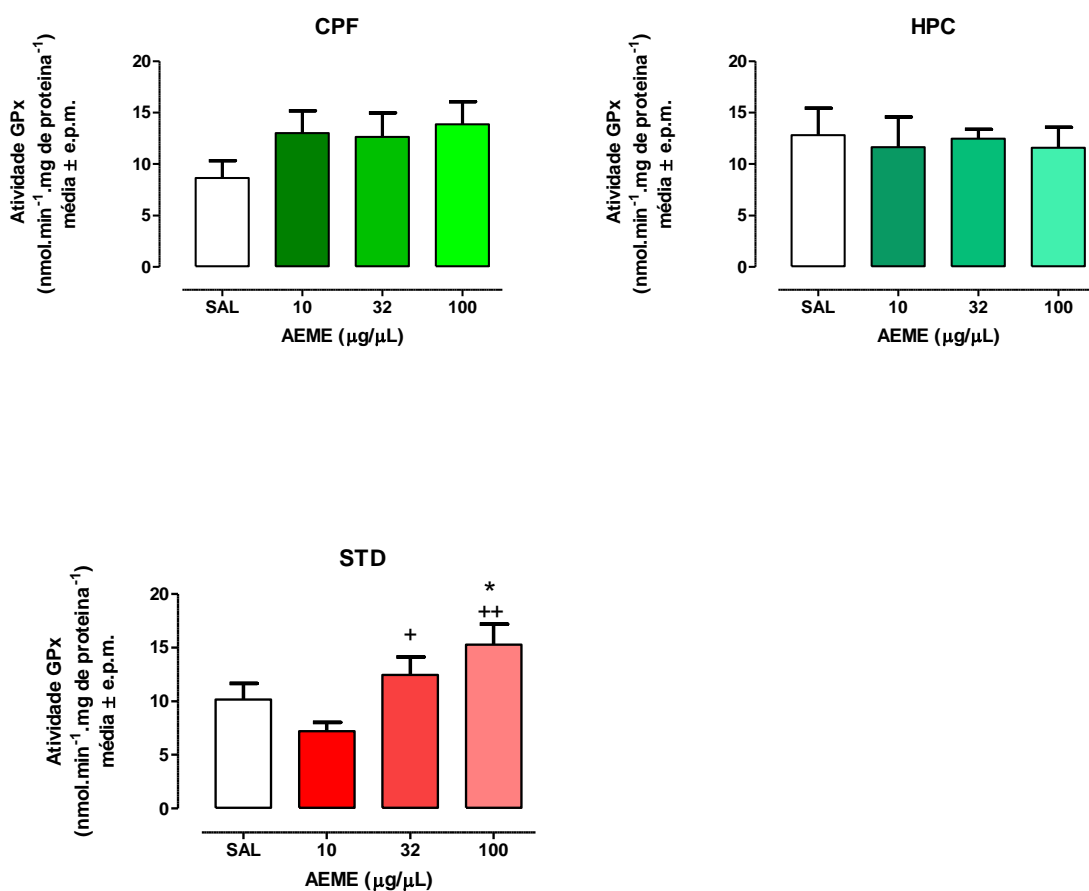


Figura 32. Concentração (média \pm e.p.m.) da atividade da enzima GPx no CPF, HPC e STD de animais submetidos à administração icv aguda de AEME nas doses de 10 μg ($n = 5$), 32 μg ($n = 5$) e 100 μg ($n = 5$) ou salina ($n = 5$). Os valores estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. * $P < 0,05$ comparado ao grupo salina. + $P < 0,05$ comparado à dose de 10 μg e ++ $P < 0,01$ comparado à dose de 10 μg .

A ANOVA de 1 via para as amostras independentes não detectou diferenças estatisticamente significantes no CPF e HPC nas diferentes doses da AEME ou salina.

Entretanto a ANOVA de uma via para amostras independentes detectou diferenças estatisticamente significantes [$F(3,16) = 4,955$; $P=0,0128$] na concentração da atividade da enzima GPx em animais submetidos à administração aguda icv da AEME ou salina no estriado. O teste de comparações múltiplas de Bonferroni demonstrou que a concentração da atividade de GPx no STD de animais do grupo que recebeu a dose de 100 μg ($P < 0,05$) foi maior quando comparadas ao grupo controle (salina) e também foi maior na dose de 32 μg ($P < 0,05$) e 100 μg ($P < 0,01$) quando comparados à dose de 10 μg .

4.3.5 Atividade da enzima SOD

A atividade da enzima antioxidante SOD foi analisada em homogenato tecidual do CPF, HPC e STD de animais submetidos à administração aguda icv de AEME nas doses de 10 μg ($n = 5$), 32 μg ($n = 5$) e 100 μg ($n = 5$) ou salina ($n = 5$). Os valores da concentração (média \pm e.p.m.) ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$) nas áreas cerebrais estudadas estão expressos na figura 33.

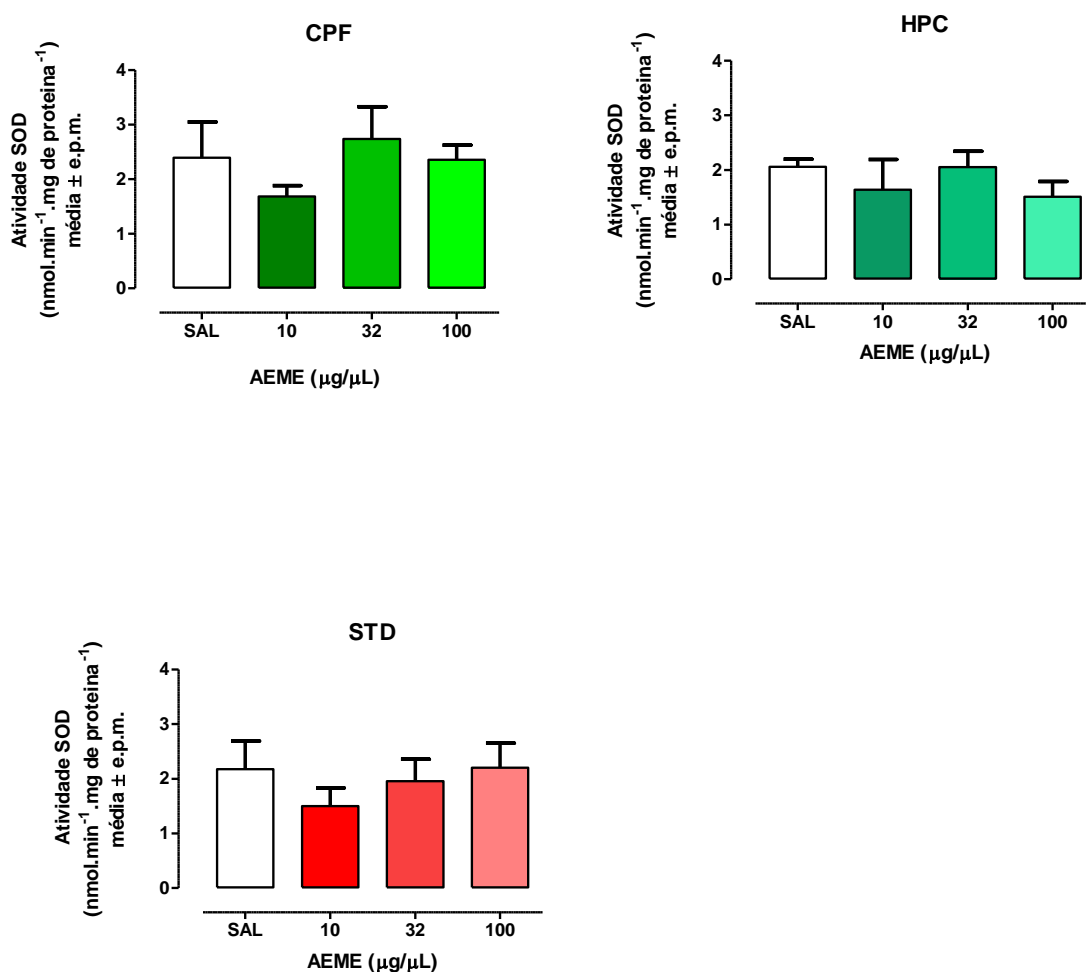


Figura 33. Concentração (média ± e.p.m.) da atividade da enzima SOD no CPF, HPC e STD de animais submetidos à administração icv aguda de AEME nas doses de 10 µg (n = 5), 32 µg (n = 5) e 100 µg (n = 5) ou salina (n = 5). Os valores estão expressos em nmol.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

A ANOVA de 1 via para as amostras independentes não detectou diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das áreas cerebrais analisadas nas diferentes doses de AEME quando comparados ao grupo controle (salina) em relação a atividade da enzima antioxidante SOD.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que a administração intracerebroventricular do produto da pirólise da cocaína, AEME, nas doses de 32 e 100 μg prejudicaram a memória operacional espacial de longa duração e aumentou de forma significativa os produtos avançados de oxidação protéica e a atividade da enzima antioxidante GPx no estriado de ratos.

Sabe-se que a prevalência da utilização de drogas de abuso é algo alarmante no Brasil. Como citado anteriormente, o levantamento sobre consumo de drogas coordenado por Laranjeira e colaboradores (2012) demonstrou que a prevalência de uso da cocaína em pó uma vez na vida pela população adulta (18 anos ou mais) foi de aproximadamente 5 milhões de brasileiros, enquanto a prevalência do uso do crack foi de 1,7 milhões de brasileiros. Importante ressaltar que, o *crack* é seis vezes mais prejudicial e causa uma maior dependência do que a cocaína em pó (PIRES, et al., 2012). Além disso, houve o aumento da procura por atendimento médico em clínicas especializadas pelos usuários de *crack* (DUNN, et al., 1996). Porém quando o usuário fuma o *crack*, além da cocaína ele também estará exposto ao produto da sua pirólise, a AEME.

Os estudos que existem sobre drogas de abuso e as alterações comportamentais em grande parte abrangem os efeitos da cocaína, ou *crack*. Animais apresentaram prejuízo de memória operacional numa tarefa em um labirinto aquático em T após a auto-administração de 1,5 mg/kg de cocaína (SUDAI et al., 2010). Semelhante resultado foi observado por George e col. (2008) com uma dose menor de cocaína, 0,5 mg/kg, onde os animais também apresentaram prejuízo de memória operacional numa tarefa de labirinto em T após auto-administração da substância.

Já em relação especificamente à AEME, Scheidweiler e col. (2003) relatam que exposições repetidas à AEME possivelmente cause um déficit cognitivo associado ao *crack*.

Areal e col. (2015) realizaram um estudo em que camundongos eram submetidos à inalação de 5 gramas de *crack*, duas sessões por dia, por um período de onze dias,

tendo como resultado uma hiperlocomoção e também um comportamento peculiar caracterizado como “jumping”. Os autores ressaltam que a análise de sangue dos animais tratados feita por GC-MS detectou uma concentração de AEME muito maior que a cocaína, sugerindo que as alterações encontradas nesse estudo sejam mais decorrentes da ação da AEME do que a cocaína (AREAL et al., 2015).

Como pode ser observado, apesar de existirem estudos que correlacionam a cocaína e o *crack* com alterações comportamentais, em relação à AEME, não há nenhum dado na literatura que tenha relatado os efeitos dessa substância sobre a memória operacional espacial de ratos. Por isso, um dos nossos objetivos foi avaliar os efeitos da administração icv de diferentes doses da AEME sobre a memória operacional de ratos desempenhando tarefas com retardo de 1 hora no LR-8.

O modelo experimental deste estudo utilizou o LR-8 como paradigma para avaliar a memória operacional espacial em roedores. O LR-8 que foi inicialmente proposto por Olton e Samuelson (1976) continua sendo uma das ferramentas mais sensíveis e confiáveis para avaliar a memória operacional espacial em ratos. Todos os animais inseridos no protocolo comportamental atingiram o critério de aprendizagem, alcançando melhora gradativa do desempenho tanto nas tarefas sem o retardo quanto nas tarefas com o retardo de 5 segundos, utilizadas para avaliar o desempenho dos animais e estes dados estão de acordo com os estudos de aprendizagem animal descritos na literatura (OLTON e SAMUELSON, 1976; OLTON et al., 1977; OLTON, 1979).

Os resultados obtidos foram que nas doses de 32 e 100 µg houve um prejuízo na memória operacional de ratos, quando avaliados no desempenho da tarefa com retardo de 1 hora em relação a salina como solução controle. Também foi usado como solução controle a acetonitrila, pelo fato de ser o solvente da AEME e para confirmar que este solvente não prejudicaria o desempenho dos animais em tarefas com o retardo de 1 hora. Os resultados demonstraram que não foi encontrado nenhum prejuízo comportamental quando comparado com a salina.

O CPF apresenta inervação dopaminérgica particularmente proeminente. E sabe-se que a densidade dos receptores dopaminérgicos do tipo D₁ são predominantes,

quando comparados com a densidade dos receptores D_2 . Essas inervações dopaminérgicas tem um papel modulador importante em processos cognitivos, dentre eles a memória operacional a qual envolve particularmente os receptores do tipo D_1 sendo que uma atividade excessiva destes receptores é prejudicial para esta função cognitiva (JUCAITE, 2002; ZHART et al., 1997; GASPAR, 1995).

Os neurônios dopaminérgicos da ATV expressam receptores nicotínicos e muscarínicos e a ativação colinérgica nesta estrutura está associada a aumento dos disparos dopaminérgicos na ATV. Esses neurônios dopaminérgicos, por sua vez, projetam-se para diversas áreas cerebrais dentre elas o CPF, o qual contribui para o funcionamento executivo, para o processamento de controle cognitivo, essencial para a manutenção de representação de memórias “online”. De acordo com algumas evidências recentes, essa especificidade de inervação ATV-CPF-ATV pode estar relacionado com aspectos importantes da aprendizagem e das funções do CPF como um todo (YOU et al., 2008; BRIAND et al., 2007; DALLEY et al., 2004).

O CPF regula o comportamento em colaboração com um conjunto de outras estruturas corticais e subcorticais, dentre elas o HPC e o STD, que juntas constituem a maquinaria cerebral para a cognição espacial e memória (FLORESCO et al., 1997; GOLDMAN-RAKIC, 1994). E com relação ao desempenho de tarefas com retardo, os resultados de Floresco e col. (1997) sugerem que as interações entre o CPF e o STD ventral estão envolvidas na transformação da memória espacial, processada por circuitos corticais hipocampais, em uma sequência eficiente de respostas motoras direcionadas para objetivos (FLORESCO et al., 1997). O STD também tem papel fundamental no aprendizado motor, como na aquisição de respostas sequenciais como virar à esquerda ou à direita em labirintos (MYHER, 2003).

Diversos estudos indicam que a AEME apresenta atividade colinérgica (ERZOUKI, et al., 1995; GARCIA et al., 2015; YANG et al., 2001; JACOB et al., 1990; SCHEIDWEILER et al., 2003). A acetilcolina (ACh) tem um papel importante como neuromodulador chave na aprendizagem e na memória, conseqüentemente a sua depleção está ligada a distúrbios de memória, tais como a doença de Alzheimer (ECKART et al., 2016; WILLIAMS e ADINOFFI, 2008). Estudos experimentais

demonstram que a interrupção da mediação colinérgica em ratos adultos leva a desempenho deteriorado em modelos que utilizam labirintos (RAUCH e RASKIN, 1984). O HPC contém as concentrações mais elevadas de ACh no sistema nervoso central, e este neurotransmissor é um componente crítico na formação da memória hipocampal (WILLIAMS e ADINOFFI, 2008).

O sistema colinérgico está também envolvido nos efeitos de drogas. Níveis extracelulares de ACh são aumentados na ATV durante a auto-administração de drogas, como a cocaína. Além disso a sinalização colinérgica no STD e no NAcc tem um papel crítico na compulsão (“*craving*”) por drogas (PICCIOTTO et al., 2012; YOU et al., 2008). Dentro do circuito de recompensa cerebral, os sistemas mesolímbicos dopaminérgicos e colinérgicos atuam estreitamente na ATV, CPF e NAcc (SOFUOGLU e MOONEY, 2009).

Como citado anteriormente, Jacob e col. (1990) mostraram a similaridade estrutural da AEME com a estrutura da arecolina, a qual é um agonista colinérgico. Devido a similaridade das estruturas e por não ter na literatura dados comportamentais que envolvam o efeito da AEME, houve a necessidade de procurar estudos sobre o efeito da arecolina relacionado a parâmetros comportamentais, para verificar se essa substância também provocou algum prejuízo no desempenho de animais ao realizar alguma tarefa.

Flood e col. (1981), realizaram um estudo em que camundongos foram treinados a realizar tarefas no labirinto em T, no qual o objetivo era percorrer um dos braços do labirinto sem levar choques e avaliar a capacidade de retenção da tarefa após 7 dias. Para isso, foram administradas arecolina icv nas doses de 0,05; 0,10; 0,50; 1 µg e salina como solução controle. Os autores observaram que a porcentagem de “esquecimento” da tarefa na dose de 1 µg foi maior quando comparado ao controle. Segundo os autores uma possível explicação para isso estaria relacionada com o fenômeno da dessensibilização do receptor, que ocorre quando o receptor tem uma atividade prolongada (geralmente induzida pela aplicação direta de ACh ou um agonista).

Outro estudo envolvendo um agonista colinérgico foi realizado por Bunce e col. (2003), em que avaliaram o efeito da administração intra septal (núcleo septal medial) de oxotremorina no desempenho de animais ao realizar tarefas com retardo (DNMTS- *delayed-non-match-to sample*) no labirinto radial. As doses utilizadas foram de 0,1; 5,0; 10 µg e salina como controle. Os resultados demonstraram que ao realizar a tarefa, a dose de 10 µg foi a que provocou maior efeito amnésico nos animais quando comparado ao controle.

Pode-se perceber que assim como a AEME os estudos que envolveram agonistas colinérgicos tiveram maior prejuízo comportamental nas maiores doses quando comparado ao controle, ou seja, os efeitos de prejuízo colinérgico sobre o desempenho cognitivo foram dose-dependente.

Também é importante ressaltar que o prejuízo comportamental provocado pelo efeito de drogas de abuso pode estar relacionado com o estresse oxidativo no sistema nervoso central, como foi sugerido por BASHKATOVA e col. (2005). Neste estudo os autores relataram que o estresse oxidativo observado em ratos jovens após a exposição no útero à cocaína possa estar envolvido em déficits comportamentais. Além disso, Pomierny-Chamiolo e col. (2013) enfatiza que o estresse oxidativo desempenha um papel na memória e no aprendizado, e deficiências nessas funções podem estar envolvidas em mecanismos de toxicidade e adição ocasionados pelos efeitos de drogas (BASHKATOVA et al., 2005; POMIERNY-CHAMIOLO et al., 2013).

Ainda não existem estudos *in vivo* sobre os efeitos neurotóxicos da AEME no sistema nervoso central relacionados com o estresse oxidativo, sejam por meio do dano oxidativo, como por exemplo, a peroxidação lipídica e o AOPP, ou mesmo com a atividade das enzimas antioxidantes. Entretanto, em relação a produção de estresse oxidativo no sistema nervoso central pelos efeitos da cocaína, já existem alguns dados. Por exemplo, a administração intraperitoneal (IP) aguda de 20 mg/kg de cocaína aumentou a produção de hidroperóxidos e peroxidação lipídica no córtex frontal e no STD de ratos (DIETRICH et al., 2005). A peroxidação lipídica também foi aumentada no HPC de ratos jovens, quando expostos à cocaína (mães receberam 20 mg/kg ip) durante a gestação (BASHKATOVA et al., 2005). Este aumento foi

observado no CPF e NAcc de ratos após a administração sistêmica aguda de cocaína (30 mg/kg) (NUMA et al., 2008). Existem evidências sobre a relação do estresse oxidativo na patogênese e no desenvolvimento da dependência da cocaína e outras substâncias (LÓPEZ-PEDRAJAS et al., 2015). É importante ressaltar, que as estruturas cerebrais em questão (NAcc, CPF e HPC) estão relacionadas aos efeitos recompensatórios relacionados a cocaína, bem como processos motivacionais que estão implicados na dependência de drogas de abuso (POMIERNY-CHAMIOLO et al., 2013).

Com isso nosso objetivo foi avaliar os efeitos da administração intracerebroventricular de diferentes doses da AEME sobre parâmetros oxidativos no CPF, STD e HPC de animais através de: peroxidação lipídica (TBA-RS), produtos avançados de oxidação protéica (AOPP), e a atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx.

Um dos danos oxidativos que foram analisados nesse trabalho foi dos produtos avançados de oxidação protéica (AOPP), que correspondem as proteínas que são danificadas por estresse oxidativo, mais especificamente a albumina e seus agregados. O AOPP é formado principalmente por oxidantes clorados, incluindo o ácido hipocloroso e cloraminas, que resultam de atividade da mieloperoxidase (KORKMAZ et al., 2013). Níveis elevados de AOPP contribuem para o aumento da produção de ERO e são encontrados em algumas doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer e de Parkinson. Altunoglu e col. (2014) analisaram o plasma de pacientes com doença de Alzheimer e perceberam que os níveis de AOPP estavam mais elevados quando comparados com o grupo controle. Resultados de outro estudo demonstraram níveis significativamente mais elevados de AOPP no soro de pacientes com doença de Parkinson quando comparados ao grupo controle (MEDEIROS et al., 2016).

A fim de avaliar os efeitos da administração icv de diferentes doses da AEME e salina como solução controle, no estresse oxidativo, especificamente o AOPP, percebemos que no STD de ratos houve diferenças estatisticamente significantes na dose de 100 µg em relação a dose de 10 µg da AEME, ou seja, houve uma maior

oxidação de proteínas na dose de 100 µg em relação a dose de 10 µg. Entretanto, no CPF e HPC de ratos não houve diferença estatisticamente significativa.

Um estudo realizado em nosso laboratório que ainda não foi publicado apresentou resultados semelhantes, em que ratos expostos à inalação repetida (5 dias) do *crack* (3 g/dia) tiveram aumento dos níveis de AOPP no estriado dos animais tratados e também apresentaram prejuízo significativo na memória operacional espacial. Além disso, foram feitas análises no sangue desses animais por GC-MS onde foi detectada somente a presença da AEME, sugerindo que os efeitos observados possam ser mais decorrentes da ação dessa droga (LIPAUS, 2017).

Esse aumento nos níveis de AOPP no estriado possivelmente tenha ocorrido pelo fato de o sistema nervoso central ser particularmente vulnerável aos danos oxidativos, e uma das razões para isso é a sensibilidade aos ataques de radicais livres, além de ter uma alta taxa de consumo de oxigênio, e um déficit relativo de sistemas de defesa antioxidante em comparação com outros órgãos (FLOYD, 1992; HALLIWELL, 1992; HALLIWELL, 2006). Além disso, o STD é uma região cerebral que tem projeções dopaminérgicas, e vale ressaltar que a auto-oxidação da dopamina pode gerar radicais livres como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ânion superóxido (O_2^-) (HERMIDA-AMEIJEIRAS, apud POMIERNY-CHAMIOLO, 2013, DIETRICH et al., 2005). Sugere-se que o prejuízo da memória operacional espacial observado no experimento comportamental tenha correlação com o aumento da produção de ERO no estriado, já que essa região está integrada com o CPF, o qual também apresenta inervações dopaminérgicas (JUCAITE, 2002; ZHART et al., 1997; GASPAR, 1995; FLORESCO et al., 1997).

Destaca-se que não houve aumento significativo dos níveis de TBA-RS no CPF, HPC e STD de ratos, da mesma forma que os níveis de AOPP também não estiveram aumentados no CPF e HPC. Entretanto, já foi descrito anteriormente que a cocaína produz peroxidação lipídica no sistema nervoso central (DIETRICH et al., 2005; BASHKATOVA et al., 2005; NUMA et al., 2008), com isso, uma possível explicação para os resultados desse estudo seja pelo fato da AEME ter sido administrada isoladamente, pois de acordo com o estudo *in vitro* de Garcia e col. (2012) a AEME quando associada com a cocaína possui um efeito neurotóxico

aditivo, desse modo propõe-se que no estudo *in vivo* aconteça o mesmo efeito é somente a administração de AEME não foi suficiente para poder causar a peroxidação lipídica.

Uma das atividades enzimáticas avaliadas no trabalho foi a atividade da GPx, essa enzima fica localizada no citosol e na matriz mitocondrial e é responsável pela redução do peróxido de hidrogênio e outros peróxidos a água ou álcool, utilizando como cofator a glutathione reduzida (GSH) (VASCONCELOS et al., 2007). Como já foi citado anteriormente, alguns autores observaram a indução da atividade da glutathione peroxidase reduzida (GSH-Px) no córtex frontal e no STD de ratos após uma dose única ou administração crônica (1 injeção/dia) de 20 mg/kg de cocaína por 10 dias. Em outro estudo houve a diminuição da atividade da GPx em HPC de ratos após administração de cocaína (15 mg/kg IP). Resultado semelhante foi encontrado por López-pedrajas e col. (2015) onde houve diminuição da atividade da GPx em cerebelo de ratos após administração diária de cocaína (15 mg/kg IP) por 18 dias (DIETRICH et al., 2005; MURIACH et al., 2010).

Já em relação ao efeito da AEME e o sistema antioxidante enzimático, Garcia (2009) avaliou a atividade da enzima GPx em cultura primária de células hipocâmpais expostas à 1 mM de AEME e 2 mM de cocaína e percebeu uma redução da atividade da GPx após 3 horas de incubação, tanto após a exposição à AEME e cocaína, quanto a associação entre as duas. O autor salienta que talvez este fato tenha ocorrido devido as diminuições da quantidade de GSH, que segundo Poon e col. (2007) é o maior componente do sistema antioxidante no cérebro.

Para investigar os efeitos da administração icv de diferentes doses da AEME e salina como solução controle, na atividade de enzimas antioxidantes, especificamente a enzima GPx, percebemos que no STD de ratos houve uma indução da atividade da GPx na dose de 100 µg quando comparados ao grupo controle, e também na dose de 32 µg e 100 µg da AEME quando comparado com a dose de 10 µg. Porém, no CPF e HPC não houve diferenças estatisticamente significantes.

Dietrich e col. (2005) observaram o aumento da produção de ERO no STD de ratos após a administração de cocaína, bem como a indução da atividade de GSH-Px. Os autores ressaltam que existem mecanismos compensatórios, como as atividades das enzimas antioxidantes que ocorrem em resposta ao aumento do estresse oxidativo. Dessa forma, uma possível explicação para o efeito da AEME na indução da atividade da GPx no estriado, tenha ocorrido devido a um mecanismo compensatório em resposta ao aumento de ERO produzido pelo AOPP no STD.

O efeito da administração icv de diferentes doses da AEME sobre a atividade das enzimas antioxidantes (CAT e SOD) no CPF, HPC e EST de ratos e também a atividade da enzima GPx no CPF e no HPC não foram suficientes para detectar diferenças estatisticamente significantes. Destaca-se que o tratamento utilizado no estudo foi agudo, pelo fato da AEME ser uma substância de uso restrito e de difícil acesso para fins científicos.

É importante ressaltar que esse estudo é o primeiro que aborda sobre os efeitos da administração icv da AEME sobre a memória operacional de ratos bem como o primeiro estudo *in vivo* que analisou o efeito da AEME sobre parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo. A partir dos resultados encontrados pode-se dizer que a AEME prejudicou a memória operacional espacial de ratos de maneira dose-dependente, aumentou os níveis de AOPP e induziu um aumento da atividade da enzima GPx. Estes dados em conjunto demonstram que o usuário, ao fumar o *crack*, não está exposto somente aos efeitos deletérios da cocaína em pó, mas também aos efeitos do seu produto de pirólise. É necessário que existam mais estudos que abrangem outros tipos de tratamento, como o tratamento crônico com a AEME, com análise de parâmetros comportamentais, bioquímicos, imunohistoquímicos e moleculares para uma melhor compreensão dos efeitos neurotóxicos produzidos por essa substância.

6. CONCLUSÕES

Os achados deste estudo permitem as seguintes conclusões:

- A administração intracerebroventricular de AEME nas doses de 32 µg e 100 µg prejudicou a memória operacional espacial de ratos em tarefas com retardo de 1 h no LR-8;
- No STD de ratos, a AEME induziu o aumento da oxidação de proteínas e a atividade da enzima GPx, sugerindo um efeito compensatório em resposta ao aumento da produção de ERO no STD;
- Não ocorreu aumento significativo nos níveis de TBA-RS no CPF, HPC e STD da mesma forma que não aumentou os níveis de AOPP no CPF e HPC, possivelmente pelo fato de que nesse estudo a AEME foi administrada isoladamente, ou seja, não estava associada com a cocaína.

7. REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzimology**, vol. 105: 121-126, 1984.

ALAGOZLU, H.; GORGUL, A.; BILGIHAN, A.; TUNCER, C.; UNAL, S. Increased plasma levels of advanced oxidation protein products (AOPP) as a marker for oxidative stress in patients with active ulcerative colitis. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 37: 80-85, 2013.

ALTUNOGLU, E.; GUNTAS, G.; ERDENEN, F.; AKKAYA, E.; TOPAC, I.; IRMACK, H.; DERICI, H.; YAVUZER, H.; GELISGEN, R.; UZUN, H. Ischemia-modified albumin and advanced oxidation protein products as potential biomarkers of protein oxidation in Alzheimer's disease. **Geriatr Gerontol Int**, v. 15 : 872-880, 2014.

AREAL, L.B.; RODRIGUES, L.C.M.; ANDRICH, F.; MORAES, L.S.; CICILINI, M.A.; MENDONÇA, J.B.; PELIÇÃO, F.S.; NAKAMURA-PALACIOS, E.M.; MARTINS-SILVA, C.; PIRES, R.G.W. Behavioural, biochemical and molecular changes induced by chronic crack-cocaine inhalation in mice: The role of dopaminergic and endocannabinoid systems in the prefrontal cortex. **Behavioural Brain Research**, v.290: 8-16, 2015.

BADDELEY, A.D. Working memory: looking back and looking forward. **Nature Reviews Neuroscience**, v.4: 829-839, 2003.

BADDELEY, A.D. Is working memory still working? **American Psychologist**, v. 56: 851-864, 2001.

BANNISTER, J.V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. **Methods Biochem Anal**, v. 32: 279-312, 1987.

BASTOS, F.I.; MENDES, A.; DUARTE, P.C.A.V.; BERTONI, N. Smoked crack cocaine in contemporary Brazil: the emergence and spread of 'oxi'. **Addiction**, v.106: 1190-93, 2011.

BASHKATOVA, V.; MEUNIER, J.; MAURICE, T.; VANIN, A. Memory impairments and oxidative stress in the hippocampus of in-utero cocaine-exposed rats. **NeuroReport**, v.16:1217-1221, 2005.

BRADFORD, M.M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v.72: 248-254, 1976.

BRIAND, L.A.; GRITTON, H.; HOWE, W.M.; YOUNG, D.A.; SARTER, M. Modulators in concert for cognition: modulator interactions in the prefrontal cortex. **Prog Neurobiol**, v. 83:69-91, 2007.

BOLLA, K.I.; ROTHMAN, R.; CADET, J.L. Dose related neurobehavioral effects of chronic cocaine use. **J. Neuropsychiatry. Clin. Neurosci**, v.11:361-369, 1999.

BUNCE, J.G.; SABOLEK, H.R.; J. J. CHROBAK, J.J. Intraseptal infusion of oxotremorine impairs memory in a delayed-non-match-to-sample radial maze task. **Neuroscience**, v. 121 : 259–267, 2003.

CAULKINS, J. Is crack cheaper than (powder) cocaine? **Addiction**, v.92:1437-43,1997.

CEBRID – Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas. I Levantamento Domiciliar sobre uso de drogas psicotrópicas no Brasil: Estudo envolvendo as 107 maiores cidades do País – 2001. Brasília: SENAD; 2002.

CEBRID- Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas. II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil : estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país- 2005 / E. A. Carlini (supervisão) [et. al.], -- São Paulo- UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo,2006.

CHEN, L.; XU, M. Dopamine D1 and D3 receptors are differentially involved in cue-elicited cocaine seeking. **J Neurochem.**, v. 114:530-41, 2010.

CHERUBINI, A.; RUGGIERO, C.; POLIDORI, M.; MECOCCHI, P. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radical Biology & Medicine**, v.39 : 841 – 852, 2005.

CLARK, T.; LEE, H.; ROLSTON, R.; ZHU, X.; MARLATT, M.; CASTELLANI, R.;NUNOMURA, A.; CASADESUS, G.; SMITH, M.; LEE, H.; PERRY, G. Oxidative stress and its implications for future treatments and management of alzheimer disease. **International journal of Biomedical science**, v. 6: 225-227, 2010.

CORNISH, J.W.; O'BRIEN, C.P.; CRACK COCAINE ABUSE: Na Epidemic with Many Public Health Consequences. **Annu. Rev. Public Health**, v.17:259-273, 1996.

CONRAD, M. Transgenic mouse models for the vital selenoenzymes cytosolic thioredoxin reductase, mitochondrial thioredoxin reductase and glutathione peroxidase 4. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790 : 1575–1585, 2009.

DALLEY, J.W.; CARDINAL, R.N.; ROBBINS, T.W. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.28: 771–784, 2004.

DIETRICH, J.B.; MANGEOL, A.; REVEL, M. O.; BURGUN, C.; AUNIS, D.; ZWILLER, J. **Neuropharmacology**, v. 48 : 965-974, 2005.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely movements rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 14: 5274–5278, 1988.

DONATO, E.M.; REZENDE, E.P.; RIBEIRO, M.; DA SILVA, C.J. Farmacologia e neurobiologia do consumo de *crack*. In: Ribeiro, M.; Laranjeira, R. (org). O Tratamento do Usuário de Crack: avaliação clínica, psicossocial e de risco, terapias psicológicas, farmacologia e reabilitação, ambientes de tratamento. São Paulo: CasaLeitura Médica, 2010. p.49-59.

DUNN,J.; LARANJEIRA, R.; SILVEIRA, D.; FORMIGONI,M.; FERRI, C. Crack Cocaine: an increase in use among patients attending clinics in São paulo: 1990-1993. **Substance Use & Misuse**, v. 31, 519-527, 1996.

ECKART, C.; WOZNIAK-KWASNIEWSKA, A.; HERWEG, N.A; FUENTEMILLA, L., BUNZECK, N. Acetylcholine modulates human working memory and subsequent familiarity based recognition via alpha oscillations. **NeuroImage**, v.137: 61-9, 2016.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of Aldehydic Lipid Peroxidation Products: Malonaldehyde and 4-Hydroxynonenal.**Methods Enzymol.**, v.186:407-21, 1990.

ERZOUKI, H.K; ALLEN, A.C ; NEWMAN, A.H; GOLDBERG, S.R ; SCHINDLER, C.W. Effects of cocaine, cocaine metabolites and cocaine pyrolysis products on the hindbrain cardiac and respiratory centers of the rabbit. **Life Sciences**, v. 57: 1861-1868,1995.

FANDIÑO, A.S; TOENNES, S.W; KAUERT, G.F. Studies on Hydrolytic and Oxidative Metabolic Pathways of Anhydroecgonine Methyl Ester (Methylecgonidine) Using Microsomal Preparations from Rat Organs. **Chem. Res. Toxicol**, v. 15: 1543-1548, 2002.

FLOYD, R.A. Antioxidants, oxidative stress and degenerative, neurological disorders. **Proc Soc Exp Biol Med**, v 222: 236-245, 1999.

FLORESCO, S.B.; SEAMANS, J.K.; PHILLIPS, A.G. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. **The Journal of Neuroscience**, v. 17:1880–1890, 1997.

FONSECA, T.M. Efeitos do exercício físico e do extrato de soja no perfil lipídico, no estresse oxidativo e na aterosclerose em camundongos deficientes do gene para o receptor de LDL. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos)- Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimento, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

FUSTER, J.M. The Prefrontal Cortex- An Update: Time Is of the Essence. **Neuron**, v. 30: 319–333, 2001.

FUSTER,J.M. Frontal lobe and cognitive development. **Journal of Neurocitology**, v. 31: 373 – 385, 2002.

FLOOD, J.F.; LANDRY, D.W., JARVIK, M.E. Cholinergic receptor interactions and their effects on long-term memory processing. **Brain Research**, v. 215: 177-185, 1981.

GARCIA, R.C.T.; DATI, L.M.M.; FUKUDA, S., et al. Neurotoxicity of anhydroecgonine methyl ester, a crack cocaine pyrolysis product. **Toxicological sciences**, v. 128: 223–34, 2012.

GARCIA, R.C.T. Efeitos neurodegenerativos da metilecgonidina e da cocaína em cultura celular primária de hipocampo.2009.Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Programa de Pós- Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GARCIA, R.C.T. Envolvimento da metilecgonidina, produto de pirólise da cocaína, na farmacodependência. 2014. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Programa de Pós- Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

GARCIA, R.C.T.; DATI, D.; TORRES, L.H. et al. M1 and M3 muscarinic receptors may play a role in the neurotoxicity of anhydroecgonine methyl ester, a cocaine pyrolysis product. **Scientific Reports**, v.5, 2015.

GARCIA, R.C.T.; TORRES, L.H., BALESTRIN, N.T.; et al. Anhydroecgonine methyl ester, a cocaine pyrolysis product, may contribute to cocaine behavioral sensitization. **Toxicology**, v.376: 44-50, 2015.

GASPAR, P.; BLOCH, B.; LE MOINE, C. D1 and D2 receptor gene expression in the rat frontal cortex: cellular localization in different classes of efferent neurons. **European Journal of Neurosciences**, v. 7: 1050 – 1063, 1995.

GEORGE, O.; MANDYAM, C.; WEE, S.; KOOB, G. Extended access to cocaine self-administration produces long-lasting prefrontal cortex-dependent working memory impairments. **Neuropsychopharmacology**, v. 33: 2474–2482, 2008.

GIOVANNINI, M.G.; BARTOLINI, L.; KOPF, S.R.; PEPEU, G. Acetylcholine release from the frontal cortex during exploratory activity. **Brain Res**, v. 784: 218-27, 1998.

GOODMAN, J.; PACKARD, M.G. Memory systems and the addicted Brain. **Frontiers in Psychiatry**, v. 7:24, 2016.

GOLDMAN-RAKIC, P.S. Cellular and circuit basis of working memory in prefrontal cortex in nonhuman primates. **Prog Brain Res**, v. 85:325-36, 1990.

GOLDMAN-RAKIC, P.S. Working Memory and the Mind. **Scientific American**, v. 276: 110-117, 1992.

GOLDMAN-RAKIC, P.S. Working memory dysfunction in schizophrenia. **J Neuropsychol Clin Neurosci**, v. 6:348 –357, 1994.

GOLDSTEIN, R.A.; DERLAURIERS, C.; BURDA, A.; JOHNSON-ARBOR, K. Cocaine: history, social implications, and toxicity: a review. **Semin Diagn Pathol**, v. 26 : 10-7, 2009.

GOLDSTEIN, R.A.; VOLKOW, N.D. Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. **Am J Psychiatry**, v.159: 1642–1652, 2002.

GOLDSTEIN, R. Z.; VOLKOW, N. D. Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. **Nature reviews Neuroscience**, v. 12:652-669, 2011.

GUTTERIDGE, J.; BARRY HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 899:136-47, 2000.

GUTTERIDGE, J.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393: 561–564, 2010.

HATSUKAMI, D.K.; FISCHMAN, M.W. Crack cocaine and cocaine hydrochloride: are the differences myth or reality? **JAMA**, v.276: 1580-8, 1996.

HALLIWELL, B. Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. **J. Neurochem.**, v. 59, 1992.

HALLIWELL, B., WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, 231–255, 2004.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **Am J Clin Nutr**, v.57: 715-725, 1993.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. **Journal of Neurochemistry**, v. 97, 1634-1658, 2006.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35: 1147- 1150, 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants—quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, 2011

HERMIDA-AMEIJEIRAS, A.; MÉNDEZ-ÁLVAREZ, E.; SÁNCHEZ-IGLESIAS, S.; SANMARTÍN-SUÁREZ, C.; SOTO-OTERO, R. Autoxidation and MAO-mediated metabolism of dopamine as a potential cause of oxidative stress: role of ferrous and ferric ions. **Neurochemistry International**, v.45: 103-116, 2004.

HYMAN, S.E., MALENKA, R.C. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. **Nat Rev Neurosci**, v.2: 695-703, 2001.

HYMAN, S.E.; MALENKA, R.C.; NESTLER, E. J. Neural Mechanisms of Addiction: The Role of Reward-Related Learning and Memory. **Annu. Rev. Neurosci**, v. 29: 565-598, 2006.

IZQUIERDO, I. Memória. Porto Alegre: Artmed, 2002.

JACOB, P.; LEWIS, E.R.; ELIAS-BAKER, B.A.; TONES, R.T.A. Pyrolysis product, anhydroecgonine methyl ester (methylecgonidine), is in the urine of cocaine smokers. **J Anal Toxicol**, v. 14: 353–357, 1990.

JOFFE, M.E.; GRUETER, C.A.; GRUETER, B.A. Biological substrates of addiction. **Wiley Interdiscip Rev CognSci**, v.5: 151–171, 2014.

JUCAITE, A. Dopaminergic modulation of cerebral activity and cognitive functions. **MEDICINA**, v.38: 357 – 362, 2002.

JULIEN, R.M. A primer of drug action: a concise, nontechnical guide to the actions, uses and side effects of psychoactive drugs. 7ed. New York: W.H. Freeman, 125-143, 1995.

KALOUSOVÁ, M.; ZIMA, T.; TESA, V.; DUSILOVÁ-SULKOVÁ, S.; SKRHA, J. Advanced glycoxidation end products in chronic diseases—clinical chemistry and genetic background. **Mutation Research**, 2005

KARCH, S.B. Cocaine: history, use, abuse. **Journal of the royal society of medicine**, v. 92,393-397, 1999.

KESNER, R.P. Subregional analysis of mnemonic functions of the prefrontal cortex in the rat. **Psychobiology**, v. 28: 219-228, 2000.

KINTZ, P.; CIRIMELE.V.; SENGLER. C.; MANGIN, P. Testing Human Hair and Urine for Anhydroecgonine Methyl Ester, a Pyrolysis Product of Cocaine. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 19, 1995.

KOOB, G.F.; BLOOM, F.E. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. **Science**,v. 4879: 715-23, 1988.

KORKMAZ, G.; ALTINOGLU, E.; CIVELEK, S.; SOZER, V.; ERDENENB, F.; TABAKE, O.;HAFIZE UZUNC,H. The association of oxidative stress markers with conventional risk factors in the metabolic syndrome. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 6 2 : 8 2 8 – 8 3 5, 2013.

LARANJEIRA, R.; MADRUGA, C.S.; PINSKY, I.; et al. II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD). São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP, 2012.

LEHRMANN, E. ET AL. Transcriptional profiling in the human pré-frontal cortex: evidence for two activational states associated with cocaine abuse. **The Pharmacogenomics Journal**, v: 3, 27–40, 2003.

LLOYD, R.V; SHUSTER, L.; MASON, R.P. Reexamination of the microsomal transformation of N-hydronorcocaine to norcocaine nitroxide. **Mol. Pharmacol.**, v.43:645-648, 1993.

LIPAUS, I.F.S. Efeitos comportamentais e neurotóxicos da inalação direta de *crack* em ratos. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Programa de Pós- Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2017.

LÓPEZ-PEDRAJAS, R.; RAMIREZ-LAMELAS, D.T.; MURIACH, B.; SÁNCHEZ-VILLAREJO, M.V.; ALMANSA, I.; VIDAL-GIL, L.; ROMERO, F.J.; BARCIA, J.M., MURIACH, M. Cocaine promotes oxidative stress and microglial-macrophage activation in rat cerebellum. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v.9:1-10, 2015.

LURIA, A.R. **Fundamentos de Neuropsicologia**. Editora da USP, Sao Paulo, 1981.

MACÊDO, D.S.; DE VASCONCELOS, S.M.; SANTOS, R.S.; AGUIAR, L.M.V.; LIMA,V.T.M.; VIANA, G.S.B.; SOUSA, F.C.F. Cocaine alters catalase activity in prefrontal cortex and striatum of mice. **Neuroscience Letters**, v. 387: 53–56, 2005.

MARTIN, B.R., LUE, L.P., BONI, J.P. Pyrolysis and volatilization of cocaine. **J. Anal. Toxicol**, v.13: 158-162, 1989.

MAJEWSKA, M.D. Cocaine addiction as a neurological disorder: implications for treatment. **NIDA Res. Monogr**, 163: 1–26, 1996.

MCINTYRE, C.K., MARRIOTT, L.K., GOLD, P.E. Patterns of brain acetylcholine release predict individual differences in preferred learning strategies in rats. **Neurobiol Learn Mem**, v. 79: 177–83, 2003.

MEDEIROS, M.S.; SCHUMACHER-SCHUH, A.; CARDOSO, A.M. et al. Iron and oxidative stress in Parkinson's Disease: an observational study of injury biomarkers. **Plos One**, v.11: 1-12, 2016.

MIYAKE, A.; SHAH, P. Models of working memory: mechanisms of active maintenance and executive control. **Cambridge University Press**, 1999.

MILLER, G.L.; GALANTER, E.; PRIBRAM, K.H. Plans and the structure of behavior. New York: Holt, Rinehart and Winston, 1960.

MOSELHY, H.F.; REID, R.G.; YOUSEF, S.; BOYLE, S.P. A specific, accurate, and sensitive measure of total plasma malondialdehyde by HPLC. **Journal of Lipid Research**, v. 54:852-858, 2013.

MURIACH, M.; LÓPEZ-PEDRAJAS, R.; BARCIA, J.M.; SANCHEZ-VILLAREJO, M.V.; ALMANSA, I.; ROMERO, F.J. Cocaine causes memory and learning impairments in rats: involvement of nuclear factor kappa B and oxidative stress, and prevention by topiramate. **Journal of Neurochemistry**, v.114:675-684, 2010.

MYHRER, T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. **Brain Research Reviews**, v. 41: 268–287, 2003.

NAKAMURA-PALACIOS, E.M.; ROELKE, C.E. Effects of acute or daily administration of diazepam on spatial learning and working memory. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 46: 181-190, 1997.

NAKAMURA, E.M.; DA SILVA, E.A.; CONCÍLIO, G.V.; WILKINSON, D.A.; MASUR, J. Reversible effects of acute and long-term administration of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) on memory in the rat. **Drug Alcohol Depend.**, v. 28:167-175, 1991.

NAKAHARA, Y.; ISHIGAMI, A. Inhalation Efficiency of Free-Base Cocaine by Pyrolysis of 'Crack' and Cocaine Hydrochloride. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 15: 105-109, 1991.

NESTLER, E.J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2: 119–28, 2001.

NIEDZIELSKA, E.; SMAGA, I.; GAWLIK, M.; MONICZEWSKI, A.; STANKOWICZ, P.; PERA, J.; FILIP, M. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Mol Neurobiol.**, v. 53:4094–4125, 2016.

NUMA, R.; KOHEN, R.; POLTYREVA, T.; YAKA, R. Tempol diminishes cocaine-induced oxidative damage and attenuates the development and expression of behavioral sensitization. **Neuroscience**, v. 155: 649–658, 2008.

OLTON, D.S.; SAMUELSON, R.J. Relembrence of places passed: spatial memory in rats. **Journal of Experimental Physiology: Animal Behaviour Process**, v.2: 97 – 116, 1976.

OLTON, D.S. Mazes, Maps, and Memory. **American Psychologist**, v.34: 583 – 597, 1979.

OLTON, D.S.; COLLINSON, C.; WERZ, M.A. Spatial memory and radial arm maze performance of rats. **Learning and motivation**, v.8: 289 – 314, 1977.

OLTON, D.S. The radial maze as a tool in behavioral pharmacooogy. **Physiol. Behav.**, v.40: 793 -797, 1987.

PARKS, M.H., GREENBERG, D.S.; NICKEL, M.K.; DIETRICH, M.S.; ROGERS, B.P.; MARTIN, P.R. Recruitment of additional brain regions to accomplish simple motor tasks in chronic alcohol-dependent patients. **Alcohol Clin Exp Res**, v.34: 1098-109, 2010.

PAU, C.W.H.; LEE, T.M.C.; CHAN, S.F.F. The impact of heroin on frontal executive functions. **Arch. Clin. Neuropsychol**, v. 17: 663–670, 2002.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.2007.

PERAILE, I.; GRANADO, N.; TORRES, E.; GUTIÉRREZ-LOPES, M.D.; MORATALHA, R.; COLADO, M.I.; O'SHEA, E. Cocaine potentiates MDMA-induced oxidative stress but not dopaminergic neurotoxicity in mice: implications for the pathogenesis of free radical-induced neurodegenerative disorders. **Psychopharmacology**, 2013.

PRATICÓ, D.; URYU, K.; LEIGHT, S.; TROJANOSWKI, J.Q.; LEE, V.M.Y. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. **The Journal of Neuroscience**, v. 21 :4183–4187, 2001.

PICCIOTTO, M.R.; HIGLEY, M.J.; MINEUR, S. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. **Neuron**, v. 76: 116–129, 2012

PIRES, A.; PIERI, P.; HAGE, M.; SANTOS, A.B.G.; MEDEIROS, M.C.R.; GARCIA, R.C.T.; YONAMINE, M.; HALLACK, J.; SALDIVA, P.H.N.; ZORZETTO, J.C.; BUENO, H.M.S. Repeated inhalation of crack-cocaine affects spermatogenesis in young and adult mice. **Inhalation Toxicology**, v. 24: 439–446, 2012.

POMIERNY-CHAMIOŁO, L.; MONICZEWSKI, A.; WYDRA, K.; SUDER, A.; FILIP, M. Oxidative stress biomarkers in some rat brain structures and peripheral organs underwent cocaine. **Neurotox Res.**; v. 23: 92–102, 2013.

PORTER, M.C.; MAIR, R. G. The effects of frontal cortical lesions on remembering depend on the procedural demands of tasks performed in the radial arm maze. **Behav Brain Res**, v. 87 :115-25, 1997.

POON, H.F.; ABDULLAH, L.; MULLAN, M. A.; MULLAN, M.J.; CRAWFORD, F.C. Cocaine-induced oxidative stress precedes cell death in human neuronal progenitor cells. **Neurochem. Int.**, v. 50:69-73, 2007.

RAUCH, S.L.; RASKIN, L.A. Cholinergic mediation of spatial memory in the preweanling rat: application of the radial arm maze paradigm. **Behavioral Neuroscience**, v. 98: 35-43, 1984.

REINERMAN, C.; LEVINE, H.G. The *crack* attack: politics and media in the *crack* scare. In: Reinerman C, Levine HG. *Crack in America: demons, drugs and social justice*. Berkley: University of California Press; 1997.

RIDDERINKHOF, K. R et al. Neurocognitive mechanisms of cognitive control: The role of prefrontal cortex in action selection, response inhibition, performance monitoring, and reward-based learning. **Brain and Cognition**, v. 56. 129–140, 2004.

RODRIGUES, L.C.M. Envolvimento do sistema dopaminérgico frontal nos efeitos do Delta-9-tetrahydrocannabinol sobre a memória operacional de ratos. 2006. 207f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas), UFES, Vitória, 2006.

RODRIGUES, L.C.M. ; CONTI, C. L ; NAKAMURA-PALACIOS, E. M .Clozapine and SCH 23390 prevent the spatial working memory disruption induced by delta-9-THC administration into the medial prefrontal cortex. **Brain Research**, v. 1382: 230-237, 2011.

ROSS, D.; MOLDEUS, P.; Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo – Pelfrey C (ed): *Membrane lipid oxidation*. 1th ed. **Boca Raton, CRC Press**, 151-70. 1991.

RUSSO, S. J.; NESTLER, E. J. The Brain Reward Circuitry in Mood Disorders. **Nat Rev Neurosci.**, v. 14, 2013.

SELMECI, L.; SERES, L.; ANTAL, M.; LUKÁCS, J.; REGALY-MÉREI, A.; AUSÁDY, G. Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple, fast and inexpensive automated technique. **Clin Chem Lab Med**, v. 43 :294–297, 2005.

SELMECI, L. Advanced oxidation protein products (AOPP): novel uremic toxins, or components of the non-enzymatic antioxidant system of the plasma proteome? **Free Radical Research**, v. 45: 1115–1123, 2011.

SCHEIDWEILER, K.B.; PLESSINGER, M.A.; SHOJAIE, J.; WOOD, R.W.; KWONG, T.C. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Methylecgonidine, a Crack Cocaine Pyrolyzate. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 307, 2003.

SCHEIDWEILER K.B.; SHOJAIE, J.; PLESSINGER, M.A.; WOOD, R. W.; KWONG, T. C. Stability of methylecgonidine and ecgonidine in sheep plasma in vitro. **Clin Chem**, v. 46:1787–1795, 2000.

SHIH, Y.T.; CHEN, P.S.; WU, CHI-HAN; TSENG, YU-TING; WU, YANG-CHANG; LO, YI-CHING. Arecoline, a major alkaloid of the areca nut, causes neurotoxicity

through enhancement of oxidative stress and suppression of the antioxidant protective system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49 :1471–1479, 2010.

SILVA DE MELO, L.C et al. Δ 9-THC administered into the medial prefrontal cortex disrupts the spatial working memory. **Psychopharmacology**, v.183: 54 –64, 2005.

SOFUOGLU, M.; MOONEY, M. Cholinergic functioning in stimulant addiction implications for medications development. **CNS Drugs**, v. 23 11: 939-952, 2009.

STANCAMPIANO, R.; COCCO, S.; CUGUSI, C.; SARAIS, L.; FADDA, F. Serotonin and acetylcholine release response in the rat hippocampus during a spatial memory task. **Neuroscience**, v. 89: 1135–43, 1999.

SUDAI, E.; CROITORU, O.; SHALDUBINA, A.; ABRAHAM, L.; GISPAN, I.; FLAUMENHAFT, Y.; ROTH-DERI, I.; KINOR, N.; AHARONI, S.; BEN-TZION, M.; YADID, G. High cocaine dosage decreases neurogenesis in the hippocampus and impairs working memory. **Addiction Biology**, v. 16, 251–260, 2010.

STEWART, D.J.; INABA, T.; TANG, B. K.; KALOW, W. Hydrolysis of cocaine in human plasma by cholinesteras. **Life sciences**, v. 20: 1557:1564, 1977.

TOENNES, S.W.; FANDIÑO, A.S.; HESSE, F.J.; KAUERT, G.F. Artifact production in the assay of anhydroecgonine methyl ester in serum using gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 792:345–351, 2003.

UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime). **World Drug Report**. 2015.

URSO, M.; CLARKSON, P. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189 : 41- 54, 2003.

UYLINGS, H.B.M.; GROENEWEGEN, H.J.; KOLB, B. Do rats have a prefrontal cortex? **Behavioral Brain Research**, v.146: 3-7, 2003.

VASCONCELOS, S.; GOULART, M.; MOURA, J.; BENFATO, V.; KUBOTA, L. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v. 30: 1323-1338, 2007.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in enzymology**, v. 77: 325-33, 1981.

WILLIAMS, M. J; ADINOFF, B. The role of acetylcholine in cocaine addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 33: 1779–1797, 2008.

WITKO-SARSAT, V.; FRIEDLANDER, M.; CAPEILLERE-BLANDIN, C.; NGUYEN-KHOA, T.; NGUYEN, A.; ZINGRAFF, J.; JUNGERS, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney International**, v. 49: 1304-1313, 1996.

YANG, Y., KE, Q. CAI, J., XIAO, Y., MORGAN, J.P. Evidence for cocaine and methylecgonidine stimulation of M2 muscarinic receptors in cultured human embryonic lung cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 132: 451- 460, 2001.

YOU, ZHI-BING.; WANG, B.; ZITZMAN, D.; WISE, R.A. Acetylcholine release in the mesocorticolimbic dopamine system during cocaine seeking: conditioned and unconditioned contributions to reward and motivation. **The journal of Neuroscience**, v. 28:9021–9029, 2008.

ZAHRT, J.; TAYLOR, J.R.; MATHEW, R.G.; ARNSTEN, A.F.T. Supranormal stimulation of D₁ dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex impairs spacial workinf memory performance. **The Journal of Neuroscience**, v.17: 8528 – 35, 1997.

ZILLES, K.; WREE, A. Cortex: Area and laminar structure. In: Paxinos: The rat nervous system. Forebrain and midbrain. San Diego, California: Academic Press, Inc., 374-415, 1985.